Pêches et Océans Canada | Fisheries and Oceans Canada

Sciences des écosystèmes et des océans | Ecosystems and Oceans Science

Secrétariat canadien de consultation scientifique (SCCS)

Document de recherche 2017/064

Région de la capitale nationale

Examen des méthodes de mesure de la toxicité pour les organismes aquatiques de la fraction adaptée à l'eau (WAF) et de la fraction adaptée à l'eau améliorée chimiquement (CEWAF) du pétrole

Julie Adams, Kelli Charbonneau, Danielle Tuori, R. Stephen Brown, et Peter V. Hodson

School of Environmental Studies
Queen's University
116 Barrie Street
Kingston, ON K7L3N6

April 2018

Canada

Avant-propos

La présente série documente les fondements scientifiques des évaluations des ressources et des écosystèmes aquatiques du Canada. Elle traite des problèmes courants selon les échéanciers dictés. Les documents qu'elle contient ne doivent pas être considérés comme des énoncés définitifs sur les sujets traités, mais plutôt comme des rapports d'étape sur les études en cours.

Les documents de recherche sont publiés dans la langue officielle utilisée dans le manuscrit envoyé au Secrétariat.

Publié par :

Pêches et Océans Canada
Secrétariat canadien de consultation scientifique
200, rue Kent
Ottawa (Ontario) K1A 0E6

http://www.dfo-mpo.gc.ca/csas-sccs/
csas-sccs@dfo-mpo.gc.ca

© Sa Majesté la Reine du chef du Canada, 2018
ISSN 2292-4272

La présente publication doit être citée comme suit :

Adams, J., Charbonneau, K., Tuori, D., Brown, R.S. et Hodson, P.V. 2018. *Examen des méthodes de mesure de la toxicité pour les organismes aquatiques de la fraction adaptée à l'eau (WAF) et de la fraction adaptée à l'eau améliorée chimiquement (CEWAF) du pétrole.* Secr. can. de consult. sci. du MPO. Doc. de rech. 2017/064. xii + 128 p.

Also available in English :

Adams, J., Charbonneau, K., Tuori, D., Brown, R.S. and Hodson, P.V. 2017. Review of Methods for Measuring the Toxicity to Aquatic Organisms of the Water Accommodated Fraction (WAF) and Chemically-Enhanced Water Accommodated Fraction (CEWAF) of petroleum. DFO Can. Sci. Advis. Sec. Res. Doc. 2017/064. xii + 110 p.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ x

ABSTRACT xii

1 INTRODUCTION 1

1.1 OBJET ET PORTÉE DE CETTE ANALYSE DOCUMENTAIRE 3

2 RENSEIGNEMENTS GÉNÉRAUX SUR LE BITUME DILUÉ ET LES DÉVERSEMENTS DE BITUME DILUÉ 4

2.1 PROPRIÉTÉS PHYSIQUES ET CHIMIQUES DES PRODUITS DU BITUME DILUÉ 6

2.1.1 Comparaison des propriétés du bitume dilué à celles des pétroles bruts classiques 7

2.2 EXAMEN DES DÉVERSEMENTS DE PRODUITS DU BITUME DILUÉ 9

2.2.1 Examen des scénarios d'exposition dans les déversements de bitume dilué 10

2.2.2 Établir un lien entre le comportement observé du bitume dilué dans les déversements et les méthodes d'essai de toxicité 11

3 RENSEIGNEMENTS GÉNÉRAUX SUR LES ESSAIS DE TOXICITÉ AVEC LE PÉTROLE 12

3.1 BRÈVE INTRODUCTION AUX ESSAIS DE TOXICITÉ AQUATIQUE 13

3.2 MÉTHODES STANDARDS UTILISÉES DANS LES ESSAIS DE TOXICITÉ DU PÉTROLE 14

3.3 NOMENCLATURE 15

3.4 LE PROCESSUS DU CROSERF 19

3.4.1 Documents d'orientation pour améliorer les études de la toxicité des hydrocarbures 20

3.4.2 Protocole du CROSERF pour les essais de toxicité du pétrole (Aurand et Coelho 2005) 22

3.4.3 Modifications recommandées aux méthodes normalisées, et justification 28

4 ANALYSE DOCUMENTAIRE 30

4.1 MÉTHODES D'ANALYSE DOCUMENTAIRE 30

4.1.1 Détermination des facteurs expérimentaux qui ont une incidence sur le résultat des essais de toxicité 32

4.1.2 Hydrocarbures mis à l'essai 35

4.1.3 État d'altération des huiles mises à l'essai 37

4.2 MÉTHODES DE PRÉPARATION DES SOLUTIONS D'ESSAI 39

4.2.1 Méthodes fréquemment citées de préparation des solutions d'essai 39

4.2.2 Appareil ou système de mélange pour produire les solutions de stock et d'essai 40

4.2.3 Eau de dilution pour la préparation des solutions de stock et d'essai 44

4.2.4 Ratio pétrole/eau 47

4.2.5 Taille et forme du récipient de mélange 48

4.2.6 Espace de tête dans le récipient de mélange 50

4.2.7 Dispersion chimique : Types de dispersants 51

4.2.8 Dispersion chimique : Ratio dispersant/pétrole 53
4.2.9 Dispersion chimique : Agents dispersants témoins 55
4.2.10 Conditions de mélange 56
4.2.11 Durée du mélange 57
4.2.12 Durée de sédimentation 59
4.3 MÉTHODES DE CARACTÉRISATION DU PÉTROLE ET DES SOLUTIONS D'ESSAI 60
4.3.1 Concentrations nominales et mesurées 62
4.3.2 Méthodes analytiques indiquées 63
4.3.3 Échantillons multiphasiques 65
4.3.4 Nombre d'analytes mesurés par GC-MS 66
4.4 RÉGIME D'EXPOSITION ET RÉSULTATS 67
4.4.1 Espèce, stade biologique et durée d'exposition de l'organisme d'essai 67
4.4.2 Facteurs abiotiques de l'exposition des poissons 71
4.4.3 Taille du récipient d'exposition 73
4.4.4 Matériau du récipient d'exposition 75
4.4.5 Régime d'exposition 77
4.4.6 Effets mesurés et paramètres 79
4.5 APERÇU DES MÉTHODES D'ESSAI DE TOXICITÉ DU PÉTROLE RAPPORTÉES 81
4.5.1 Variabilité des méthodes représentées dans l'analyse 81
4.5.2 Examen des méthodes utilisées pour évaluer la toxicité du bitume dilué 81
5 CADRE PROPOSÉ POUR ÉLABORER DES PROTOCOLES NORMALISÉS 82
5.1 COMBINER LES ESSAIS STANDARDS À D'AUTRES QUI SIMULENT DES CONDITIONS PROPRES AU SITE 83
5.2 ASPECT PRATIQUE DES MÉTHODES D'ANALYSE 85
5.3 CADRE PROPOSÉ 86
5.4 PROCHAINES ÉTAPES : ÉLABORATION D'UNE MÉTHODE NORMALISÉE PAR LA COLLABORATION ENTRE LES SECTEURS 98
6 RECOMMANDATIONS DE RECHERCHE 98
7 CONCLUSIONS 101
8 RÉFÉRENCES 103
9 ANNEXES 114
ANNEXE 1 : PROTOCOLES DÉFINIS PAR LE CROSERF 114
ANNEXE 2: LISTES D'ANALYTES CIBLES POUR L'ANALYSE DES COMPOSÉS VOLATILS ET SEMI-VOLATILS 119
ANNEXE 3 : CATÉGORISATION DES ESPÈCES DE POISSONS UTILISÉES DANS LES ESSAIS DE TOXICITÉ DU PÉTROLE, PAR HABITAT 121
ANNEXE 4 : EXIGENCES DE DÉCLARATION RECOMMANDÉES POUR LES ESSAIS DE TOXICITÉ, ADAPTÉ DE HANSON *ET AL.* (2016) 123

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Nombre de termes décrivant les solutions pétrole/eau ou les méthodes pour préparer ces solutions, pour les essais de toxicité (N = 223) (du tableau 2). 17

Figure 2 : Nombre de documents inclus dans l'analyse documentaire, par année de publication. Tranches d'années entre 1973 et 2016 (N = 144) 31

Figure 3 : Pourcentage des essais de toxicité de différents pétroles bruts.. 37

Figure 4 : Pourcentage de publications qui ont utilisé des huiles qui n'avaient pas subi d'altération (**Non altérée**) ou qui avaient subi une altération (**Altérée**). 38

Figure 5: Nombre d'essais de toxicité réalisés à l'aide d'un système de mélange donné pour préparer les solutions d'essai et de stock d'hydrocarbures dans l'eau. 42

Figure 6 : Pourcentage d'essais (N = 144) qui ont utilisé de l'eau douce, de l'eau de mer, les deux ou qui n'ont pas explicitement précisé (**NS**) le diluant utilisé pour préparer les mélanges de stock pétrole/eau des solutions WAF ou CEWAF (A) et les solutions d'essai (B). 46

Figure 7 : Nombre de ratios pétrole/eau signalés dans les essais de toxicité du pétrole (N=219). 48

Figure 8 : Nombre de tailles de bac utilisées pour mélanger le pétrole et l'eau pour la préparation de solutions d'essai de toxicité, **NS**, lorsque la taille du bac de mélange n'était pas précisée (N=201). 50

Figure 9 : Nombre de ratios dispersant/pétrole les plus fréquemment signalés. 55

Figure 10 : Proportion des durées de mélange (heures) de l'huile et de l'eau utilisées pour produire les solutions d'essai et durée de mélange du pétrole et du dispersant. 58

Figure 11 : Nombre des durées de sédimentation (heures) de l'huile et de l'eau utilisées pour produire les solutions d'essai. 60

Figure 12 : Proportion des méthodes de caractérisation utilisées pour tester les solutions dans l'ensemble des documents examinés (N = 144). 63

Figure 13 : Proportion d'analyses en fonction du nombre de composés d'HAP précisés. 67

Figure 14 : Nombre de durées d'exposition (jours) pour les essais de toxicité 69

Figure 15 : Pourcentage des expositions des essais de toxicité classées dans la catégorie **aiguë** (≤ quatre jours) ou **chronique** (> quatre jours) 69

Figure 16 : Nombre d'essais réalisés avec différents stades biologiques du poisson, différenciés en fonction de la toxicité aiguë (≤ 4 jours) ou chronique (> 4 jours). 71

Figure 17 : Nombre de volumes de bac d'exposition (litres) utilisés dans les essais de toxicité du pétrole.. 75

Figure 18 : Nombre de matériaux de bacs d'exposition indiqués dans cette analyse documentaire (N=152). 76

Figure 19 : Nombre de paramètres déclaré; concentration efficace médiane (**CE50**), concentration létale médiane (**CL50**), concentration minimale avec effet observé (**CMEO**) et concentration sans effet observé (**CSEO**) (N=203) 80

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Caractéristiques physiques des hydrocarbures (modifiées à partir de Fingas (2001) et de POLARIS [2013]). 7

Tableau 2 : Liste des termes couramment utilisés 16

Tableau 3 : Liste de termes apparaissant trois fois ou moins dans l'analyse documentaire et classés comme **Autres** (figure 1). 17

Tableau 4 : Liste des méthodes utilisées pour préparer les solutions pétrole/eau pour les essais de toxicité. 19

Tableau 5: Terminologie du protocole du CROSERF (tiré d'Aurand et Coelho 2005). 23

Tableau 6 : Nombre de régimes d'exposition. 78

LISTE DES ACRONYMES[1]

ALC*	Pétrole brut Arabian Light (Arabian Light crude oil)
ANSC*	Pétrole brut Alaska North Slope (Alaska North Slope Crude Oil)
AO	Agitateur orbital
APHA	American Public Health Association
APM	Agrégats de pétrole et de minéraux
ASTM	American Society for Testing and Materials
AWB*	Mélange Access Western (Access Western Blend)
BEWAF*	Fractions adaptées à l'eau améliorées biologiquement (Biologically-enhanced WAF)
BPL	Bonnes pratiques de laboratoire
BTEX	Benzène, toluène, éthylbenzène et xylènes
BWWAF*	Fractions adaptées à l'eau des vagues déferlantes (Breaking-wave WAF)
C	Constante
CB	Mélangeur commercial
CD*	Dispersions chimiques (Chemical Dispersions)
CD/E*	Dispersion/émulsion chimique (Chemical Dispersion/Emulsion)
CDO*	Pétrole dispersé chimiquement (Chemicaly-dispersed Oil)
CE50	Concentrations efficaces médianes
CEWAF*	Fraction adaptée à l'eau améliorée chimiquement (Chemically-Enhanced Water Accomodated Fraction)
CF	Flux continu
GC-FID*	Chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (Gas Chromatography – Flame Ionization Detection)

[1] Note de l'éditeur. Plusieurs acronymes présentés ici correspondent aux acronymes tels qu'utilisés dans les publications scientifiques et ne sont pas traduits en français; ils sont identifiés par une astérisque.

GC-MS*	Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (Gas Chromatography – Mass Spectroscopy)
CL50	Concentrations létales médianes
CLB*	Mélange Cold Lake (Cold Lake Blend)
CMEO	Concentration minimale avec effet observé
CMS	Composé moyen sulfureux
CO*	Pétrole brut (Crude Oil)
COET	Carbone organique extractible total
COV	Carbones organiques volatils
CROSERF*	Intervention chimique en cas de déversement de pétrole – Recherche sur les effets écologiques (Chemical Response to Oil Spills : Ecological Effects Research Forum)
CSEO	Concentration sans effet observé
DCO*	Pétrole brut dispersé (Dispersed Crude Oil)
DCWAF*	Fraction adaptée à l'eau du pétrole brut dispersé (Dispersed Crude WAF)
DEL	Dispersion à faible énergie
Dilbit	Bitume dilué
DO*	Pétrole dispersé (Dispersed Oil)
DOR*	Ratio dispersant/pétrole (Dispersant-Oil Ratio)
DOSS	Dioctylsulfosuccinate de sodium
DPE	Dispersion pétrole-eau
DR	Dilution par remontée
DSL	Diesel
DWAF*	Fraction adaptée à l'eau dispersée (Dispersed WAF)
DWH*	Deepwater Horizon
ECCC	Environnement et Changement climatique Canada
ÉIE	Étude d'impact sur l'environnement
ÉRE	Évaluation du risque environnemental
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HAPa	Hydrocarbures aromatiques polycycliques alkylés
HAP totaux	Hydrocarbures aromatiques polycycliques totaux
HCP totaux	Hydrocarbures pétroliers totaux
HECEWAF*	CEWAF à grande énergie (High Energy CEWAF)
HEWAF*	WAF à grande énergie (High Energy WAF)
HFO*	Mazout lourd (Heavy Fuel Oil)
I ou AA	Impulsion ou agitateur axial
IFO*	Mazouts intermédiaires (Intermediate fuel Oils)

ISO*	Organisation internationale de normalisation (Internationale Organization for Standardization)
LEWAF*	WAF à énergie faible (Low Energy WAF)
M	Mélange à la main
MAC	Pétrole brut Macondo
MCI	Mélange complexe indéterminé
MDO*	Pétrole dispersé mécaniquement (Mechanically Dispersed Oil)
MESA*	Hydrocarbures moyens d'Amérique du Sud (Medium South American Crude Oil)
MEWAF*	WAF à énergie moyenne (Medium Energy CEWAF)
MS*	Agitation magnétique (Mechanical Stirring)
MSB*	Mélange de pétrole non corrosif (Mixed Sweet Blend)
MSRC	Marine Spill Response Corporation
N2F0	Mazout no 2
NAS	National Academy of Sciences
NS	Non spécifié
NSC*	Pétrole brut de la mer du Nord (North Sea crude oil)
OAS*	Eau de mer contenue dans le pétrole (Oil accomodated sea water)
OCDE	Organisation de coopération et de développement économiques
P	Pompe
PBCO*	Pétrole brut de la baie Prudhoe (Prudhoe Bay Crude Oil)
PDM	Pétrole dispersé mécaniquement
RE	Recirculation de l'eau
RPE	Ratio pétrole/eau
RS	Avec renouvellement statique
S	Sonicateur
S.O.	Sans objet
SARA	Saturés, aromatiques, résines et asphaltènes
SLS*	Pétrole brut non corrosif du sud de la Louisiane (Southern Louisiana sweet crude oil)
SRC	Société royale du Canada
SRS	Sans renouvellement statique
TPH-F	Hydrocarbures pétroliers totaux mesurés par fluorescence
USEPA	United States Environmental Protection Agency
UT	Unités toxiques
UV-VIS	Spectrophotomètre opérant en ultraviolet et dans le visible

WAF*	Fraction adaptée à l'eau (Water Accomodated Fraction)
WCS*	Western Canadian Select
WSF*	Fraction hydrosoluble (Water Soluble Fraction)

RÉSUMÉ

L'expédition du bitume dilué vers les raffineries et les ports du Canada est en augmentation en raison de l'expansion de sa production au nord de l'Alberta. Le bitume dilué possède des propriétés physiques et chimiques uniques que n'ont pas les pétroles bruts classiques, notamment du fait de son altération rapide et de son adhésion et de sa viscosité plus importantes, qui ont des répercussions sur son devenir, son comportement et ses effets sur les écosystèmes marins et d'eau douce. Ces propriétés peuvent également interagir avec les protocoles d'essai de toxicité couramment utilisés et avoir une incidence sur les mesures de la toxicité, et ainsi modifier le résultat des évaluations du risque écologique des déversements de bitume dilué. Le présent rapport avait les objectifs suivants : relever les méthodes existantes pour les essais de toxicité du pétrole afin de déterminer les forces et les faiblesses pouvant guider l'élaboration de méthodes normalisées en vue de la mise à l'essai du bitume dilué; déterminer et analyser les avantages et les inconvénients de diverses méthodes d'essai, en prenant en compte la diversité de leurs objectifs; élaborer une proposition de cadre pour les méthodes d'essai de toxicité du pétrole qui fait le lien entre le type de pétrole, les espèces d'essai et l'environnement aquatique pertinent et les objectifs des essais de toxicité, qui servira de base pour la sélection de protocoles d'essai précis; et déterminer les besoins pertinents en matière de recherche.

La méthode « Intervention chimique en cas de déversement de pétrole – Recherche sur les effets écologiques (CROSERF) » a recommandé des protocoles standard pour préparer les fractions adaptées à l'eau (WAF) et les fractions adaptées à l'eau améliorées chimiquement (CEWAF) du pétrole brut en vue d'essais de toxicité. L'objectif était d'améliorer la comparabilité des données de toxicité parmi les études et leur application aux évaluations du risque écologique des déversements de pétrole. Cet examen des rapports examinés par les pairs sur les essais de toxicité avec des poissons a catalogué la gamme de méthodes réellement utilisées. La plupart des rapports a été publiée depuis 2000 et chacun d'entre eux a été évalué afin de déterminer si les méthodes respectaient les protocoles de CROSERF, fournissaient suffisamment de renseignements pour comprendre les résultats d'essai et pour appuyer les évaluations du risque écologique et, de façon générale, s'il existe des problèmes inhérents à la pratique courante. Les protocoles du CROSERF ont également été analysés afin de déterminer dans quelle mesure ils sont adaptés aux essais de toxicité du bitume dilué.

L'étude a révélé la diversité des méthodes d'essai de toxicité, un manque de production de rapports détaillés sur les méthodes, et une utilisation incohérente de la terminologie pour décrire les solutions des essais; tout cela a empêché les comparaisons de la toxicité des divers pétroles, des espèces de poissons et des conditions environnementales. Bien que la plupart des études étaient fondées sur le plan technique, elles modifiaient souvent les méthodes standard afin de s'adapter à des objectifs d'étude précis sans fournir suffisamment de détails et de justifications pour les modifications signalées. Le fait qu'elles se concentraient sur des conditions propres aux sites limitait leur applicabilité pour les études d'impact sur l'environnement et les études du risque écologique des déversements de pétrole dans différents scénarios. Heureusement, un consensus apparaît sur le fait que les résultats des essais peuvent être comparés lorsqu'il existe suffisamment d'analyses chimiques des solutions d'essai pour faire le lien entre les concentrations de pétrole dans l'eau mesurées et les effets mesurés, même lorsque les méthodes d'essai ne sont pas décrites en détail. Les analyses chimiques ont également démontré que les concentrations de pétrole diminuent au fil du temps dans la plupart des essais, et que les analyses chimiques des solutions d'essai n'exercent aucune discrimination entre les hydrocarbures dissous et les particules d'hydrocarbures. Par

conséquent, la toxicité réelle du pétrole dissous dans l'eau peut souvent être sous-estimée, ce qui renforce l'incertitude des risques estimés que présentent les déversements de pétrole.

Cet examen met à jour les protocoles CROSERF avec des recommandations visant à surpasser des problèmes précis avec le bitume dilué. Les avantages et inconvénients des diverses méthodes sont examinés et un cadre proposé est fourni sur les plans expérimentaux, la caractérisation physique et chimique des pétroles mis à l'essai, la préparation du pétrole dispersé physiquement et chimiquement, la caractérisation des solutions d'essai et l'essai de toxicité. Les besoins en matière de recherche sont présentés afin d'améliorer les plans expérimentaux, la préparation et la mise à l'essai de la toxicité des solutions de pétrole, la caractérisation chimique du pétrole d'essai et des solutions de pétrole, et les exigences en matière d'essai qui prennent en compte les caractéristiques uniques du bitume dilué et d'autres pétroles bruts et raffinés.

ABSTRACT

The shipment of diluted bitumen (dilbit) to Canadian refineries and ports is increasing with the expansion of its production in northern Alberta. Dilbit has unique physical and chemical properties relative to conventional crude oils, including rapid weathering and greater adhesion and viscosity that affect its fate, behaviour and effects in marine and freshwater ecosystems. These properties may also interact with commonly used toxicity test protocols to affect measurements of toxicity and change the outcome of ecological risk assessments of dilbit spills. The objectives of this report were: to survey existing methods for oil toxicity tests to identify strengths and weaknesses that could inform the development of standardized methods for testing dilbit; to identify and analyze the advantages and disadvantages of various test methods, recognizing diversity in their objectives; to develop a proposed framework for oil toxicity test methods that links oil type, test species and relevant aquatic environment to the goals of toxicity testing, as a basis for selecting specific test protocols; and to identify relevant research needs.

The Chemical Response to Oil Spills: Ecological Effects Research Forum (CROSERF) recommended standard protocols to prepare Water Accommodated Fractions (WAFs) and Chemically-Enhanced Water Accommodated Fractions (CEWAFs) of crude oil for toxicity tests. The intent was to improve the comparability of toxicity data among studies and their application to Ecological Risk Assessments (ERAs) of oil spills. This survey of peer-reviewed reports of oil toxicity tests with fish catalogued the array of methods actually used. Most reports were published since 2000, and each was assessed to determine if the methods followed CROSERF protocols, provided sufficient information to understand the test results and to support ERAs, and overall, whether there are problems inherent in current practice. CROSERF protocols were also analyzed to determine their suitability for toxicity tests with dilbit.

The survey identified a diversity of toxicity test methods, a lack of detailed reporting of methods, and an inconsistent use of terminology to describe test solutions, all of which hindered comparisons of toxicity among oils, fish species, and environmental conditions. Although most studies were technically sound, they often modified standard methods to suit specific study objectives without providing sufficient details and rationales for the changes reported. Their focus on site-specific conditions limited their applicability to Environmental Impact Assessments (EIAs) and ERAs of oil spills under different scenarios. Fortunately, there is an emerging consensus that test results can be compared when there are sufficient chemical analyses of test solutions to relate measured concentrations of oil in water to measured effects, even when test methods are not described in detail. Chemical analyses have also demonstrated that oil concentrations decline with time during most tests, and that chemical analyses of test solutions do not discriminate between dissolved and particulate hydrocarbons. Therefore, the true toxicity of oil dissolved in water may often be underestimated, adding uncertainty to estimated risks of oil spills.

This review updates the CROSERF protocols with recommendations to overcome specific issues with dilbit. The advantages and disadvantages of various methods are reviewed and a proposed framework is provided on experimental designs, physical and chemical characterization of test oils, preparation of physically- and chemically-dispersed oil, characterizing test solutions, and toxicity testing. Research needs are presented to improve experimental designs, the preparation and toxicity testing of oil solutions, the chemical characterization of test oil and oil solutions, and test requirements that recognize the unique characteristics of dilbit and other crude and refined oils.

1 INTRODUCTION

Les déversements de bitume dilué (dilbit) dans les écosystèmes aquatiques, suivis de son altération et son immersion rapides, ont suscité des inquiétudes quant à savoir si les méthodes d'essai de toxicité actuelles fournissent des estimations raisonnables du danger et des risques qu'il présente. Le Groupe national consultatif sur les contaminants (GNCC) de Pêches et Océans Canada a commandé cette analyse afin de déterminer si les méthodes d'essai actuelles sont adéquates pour évaluer la toxicité du bitume dilué et d'autres pétroles lourds et pour proposer un cadre de référence qui orientera les méthodes d'essai de toxicité des hydrocarbures.

Le bitume est extrait des sables bitumineux du Canada et transporté de l'Alberta aux marchés dans toute l'Amérique du Nord et vers les ports côtiers. Compte tenu de sa grande viscosité, il doit être valorisé en pétrole brut synthétique ou dilué avec des pétroles plus légers pour former le bitume dilué. La valorisation et la dilution réduisent la viscosité du bitume extrait pour permettre son écoulement dans les pipelines et le chargement et déchargement des wagons ferroviaires. Les propriétés physiques et chimiques du bitume dilué varient considérablement en fonction de la source et de la méthode d'extraction, du type et de la composition en pourcentage du diluant (liés aux températures ambiantes et au mode de transport) et de l'état d'altération. On utilise généralement des condensats de gaz naturel, du naphte ou un mélange d'autres hydrocarbures légers comme diluant. On appelle « synbit » les diluants qui comprennent du pétrole synthétique.

L'augmentation des expéditions de bitume dilué et de pétroles bruts classiques a suscité des inquiétudes quant aux incidences potentielles sur les poissons et les pêches des déversements dans les environnements marins et dulcicoles. L'une des lacunes dans les connaissances mises en évidence est la toxicité du bitume dilué et de ses composants (bitume et condensats de pétrole et de gaz) pour les organismes aquatiques. La toxicité du bitume dilué est probablement assez variable, en partie en raison des différences dans la sensibilité du nombre élevé d'espèces marines et d'eau douce qui pourraient être exposées et aussi en raison des variations de la composition chimique des condensats de pétrole et de gaz utilisés comme diluants ainsi que de la composition du bitume obtenu à l'aide de différents processus d'extraction.

La toxicité variera aussi en fonction de la nature de l'exposition, c.-à-d. si le bitume dilué flotte simplement à la surface de l'eau, s'il est dispersé en gouttelettes ou s'il recouvre les substrats immergés. Pour mesurer la toxicité, il faut préparer des gradients de concentrations de bitume dilué dans l'eau selon des méthodes publiées pour créer les dispersions mécaniques et chimiques du pétrole dans l'eau, y compris le mélange mécanique (p. ex., Nordtug *et al.* 2011), l'ajout d'agents dispersants chimiques (p. ex., Singer *et al.* 2000) et la désorption d'hydrocarbures de substrats solides (p. ex., Marty *et al.* 1997). Cependant, l'altération rapide du bitume dilué pendant la préparation d'une solution peut modifier les concentrations et la composition des solutions d'essai, en interférant avec les protocoles d'essai normalisés et en empêchant les comparaisons non biaisées de la toxicité entre les huiles, les espèces ou les conditions d'essai. Le comportement du bitume dilué lorsqu'il est exposé à l'air et les différentes méthodes pour préparer les solutions d'essai ont également une incidence sur la pertinence environnementale, c.-à-d. la capacité de prédire les incidences d'un déversement de bitume dilué dans des conditions environnementales propres au site qui pourraient influer sur les taux d'altération et la dispersion mécanique dans l'eau (p. ex., température, vent, turbulence).

La nécessité d'avoir des méthodes d'essai propres au bitume dilué illustre un conflit fondamental entre les méthodes d'essai normalisées pour mesurer les dangers de la toxicité (c.-à-d. la capacité inhérente des hydrocarbures pétroliers à causer des dommages) et l'évaluation du risque écologique de déversements potentiels et des répercussions écologiques des déversements réels. En raison des variations importantes entre les propriétés chimiques des huiles, les mesures de la toxicité pourraient être biaisées par des différences dans leurs interactions avec l'eau pendant la préparation et la mise à l'essai des solutions d'hydrocarbures. Par exemple, les pétroles lourds dont la viscosité est élevée pourraient être plus difficiles à disperser mécaniquement que les pétroles légers dont la viscosité est faible, de sorte que les pétroles lourds pourraient sembler moins toxiques que les pétroles légers, bien que leurs concentrations d'agents toxiques connus soient plus élevées. Pour établir les estimations de la toxicité les moins biaisées, un mélange à grande énergie ou une dispersion chimique pourraient être nécessaires pour créer des solutions d'essai avec des distributions par taille des gouttelettes équivalentes et des estimations de la toxicité qui reflètent réellement la composition chimique du pétrole mis à l'essai. Ces méthodes de dispersion pourraient ne pas correspondre aux conditions réelles dans un site de déversement, mais un seul essai ne peut pas modéliser la diversité des scénarios de déversement possibles. Les scénarios peuvent varier de rejets à la surface en eaux libres de quantités limitées d'hydrocarbures dans des conditions de tempête (dissipation rapide des hydrocarbures déversés et expositions à court terme) à des rejets à long terme de grands volumes d'hydrocarbures depuis des puits de pétrole à de grandes profondeurs (expositions prolongées à la surface et hydrocarbures particulaires). Les déversements de pétrole en eau douce sont plus restreints que les déversements en mer et ne se dissipent pas aussi rapidement; de plus, le mélange à grande énergie par écoulement turbulent dans les rivières peut changer considérablement l'exposition des espèces aquatiques aux hydrocarbures par rapport aux lacs ou à la haute mer. Les conditions environnementales peuvent aussi varier grandement en raison des extrêmes de température, de la salinité, du rayonnement ultraviolet, de la teneur en acides humiques de l'eau, des solides en suspension, des conditions de sécheresse ou d'inondation.

Des méthodes normalisées sont nécessaires pour établir la toxicité inhérente du pétrole et des essais propres au site sont requis pour évaluer les effets des conditions environnementales uniques lors de chaque déversement sur l'exposition des organismes aquatiques au pétrole et sur la toxicité du pétrole. Les évaluations du risque écologique (ÉRÉ) et les études d'impact sur l'environnement (ÉIE) ont pour défi d'intégrer les données sur les essais de toxicité provenant d'essais normalisés à l'estimation des expositions aux hydrocarbures des espèces aquatiques dans les conditions propres au site d'un déversement. Cette analyse est axée sur la mesure de la toxicité sans référence aux conditions propres au site, à l'exception évidente que des variations concernant les méthodes d'essai normalisées sont nécessaires pour refléter ce qui suit : les exigences concernant les données sur la toxicité qui s'appliquent aux espèces marines et d'eau douce, la disponibilité des espèces mises à l'essai couramment utilisées (p. ex., espèces d'eau froide par rapport aux espèces d'eau chaude), les effets des expositions aiguës et chroniques et les différences entre les propriétés des huiles qui pourraient avoir une incidence sur leur toxicité (p. ex., le degré d'altération du pétrole).

La normalisation des méthodes d'essai de toxicité vise à réduire au minimum l'écart dans les résultats causés par la méthode elle-même, de sorte que les variations de toxicité entre les essais peuvent être attribuées aux différents traitements appliqués (p. ex., les sources des hydrocarbures utilisés pour l'essai). Les enjeux importants sont notamment la caractérisation des solutions d'essai, la durée et la tendance de l'exposition, l'effet des gouttelettes d'hydrocarbures sur l'interprétation des données dans les essais comprenant la dispersion du pétrole et l'hypothèse selon laquelle les concentrations d'hydrocarbures dans l'eau sont corrélées à celles présentes dans les tissus (Bejarano *et al.* 2013; Landrum *et al.* 2013). La

normalisation des méthodes facilitera les comparaisons, mais la capacité des études de laboratoire à imiter des scénarios environnementaux est limitée (Coelho *et al.* 2013). Cependant, les données provenant d'essais de toxicité normalisés peuvent fournir des renseignements sur les risques relatifs associés aux concentrations mesurées des hydrocarbures dans l'environnement.

Une méthode couramment utilisée pour mettre à l'essai le pétrole brut, y compris les formulations de pétrole lourd, est la méthode du CROSERF (*« Chemical Response to Oil Spills : Ecological Research Forum »* – Intervention chimique en cas de déversement de pétrole – Recherche sur les effets écologiques) qui a été élaborée aux États-Unis avec la participation du Canada. Elle décrit les protocoles d'essai de toxicité aquatique normalisés élaborés pour réduire la variabilité d'un laboratoire à l'autre, tout en imitant une exposition « réaliste » durant laquelle les concentrations d'hydrocarbures d'origine hydrique diminuent après un seul dosage de solutions d'essai. Le document d'orientation du CROSERF décrit les méthodes pour préparer une fraction adaptée à l'eau (WAF) et une fraction adaptée à l'eau améliorée chimiquement (CEWAF) du pétrole. Les chercheurs canadiens ont appliqué cette méthode pour mesurer la toxicité du bitume dilué, mais ils ont jugé nécessaire de modifier les protocoles recommandés pour compenser l'altération rapide du bitume dilué frais pendant les essais et en raison de son adhérence et de sa viscosité plus importantes par rapport aux pétroles bruts classiques (NAS 2016).

Pour faciliter la comparaison des expériences chimiques et toxicologiques menées avec le bitume dilué entre les essais et les laboratoires, les rendre plus uniformes pour pouvoir les répéter et accroître leur utilité pour les évaluations du risque environnemental et les études d'impact sur l'environnement, il est nécessaire d'élaborer des méthodes de référence normalisées pour préparer, analyser et mettre à l'essai les solutions WAF et CEWAF de bitume dilué. La méthode devrait pouvoir s'appliquer à la plupart des produits pétroliers, sinon tous, expédiés au Canada. Outre la mesure de la toxicité aquatique des produits du bitume dilué « frais », la méthode devrait aussi inclure les essais de produits « altérés » pour mieux comprendre les répercussions toxicologiques de l'altération, plusieurs heures, jours et semaines après un déversement. Cependant, les essais de toxicité des hydrocarbures sont très complexes en raison des très nombreuses variables d'essai qui pourraient avoir une incidence sur la toxicité mesurée, mais qui n'ont pas été évaluées de manière systématique. Ainsi, il est difficile d'indiquer une seule méthode « standard » pour les produits pétroliers classiques ou le bitume dilué. Par conséquent, la présente analyse présente un cadre proposé de mise à l'essai offrant une certaine souplesse dans le choix des méthodes qui porte sur des objectifs précis et comprenant des recommandations concernant l'analyse chimique de solutions d'essai afin de faciliter et d'améliorer les comparaisons de résultats entre les diverses études. Tout au long de l'analyse, les besoins en matière de recherche figurent dans des encadrés (besoins prioritaires en gras) et d'autres recommandations sont présentées en italique.

1.1 OBJET ET PORTÉE DE CETTE ANALYSE DOCUMENTAIRE

L'objectif de la présente analyse est de promouvoir une plus grande cohérence dans la préparation, l'analyse et les essais de toxicité aquatique des solutions WAF et CEWAF de bitume dilué et des produits pétroliers connexes, des résultats plus reproductibles et des comparaisons plus significatives entre les espèces mises à l'essai et les formulations pétrolières.

Les objectifs précis de l'analyse sont les suivants :

1. Relever les méthodes existantes qui ont été signalées pour la préparation, l'analyse et les essais de toxicité des solutions WAF et CEWAF de pétrole brut, des pétroles raffinés et du

bitume dilué, en reconnaissant les divers objectifs des essais et par conséquent, les critères ou les exigences des méthodes d'essai. Compte tenu du peu de rapports sur la toxicité du bitume dilué, cette analyse examine les forces et les faiblesses des méthodes d'essai concernant les produits pétroliers traditionnels lorsqu'ils orientent l'élaboration de méthodes normalisées pour le bitume dilué.

2. Déterminer et analyser les avantages et les inconvénients des diverses méthodes pour la préparation, l'analyse et la mise à l'essai de solutions de pétrole dans l'eau, compte tenu des objectifs de l'essai.
3. Élaborer un cadre de référence pour les méthodes d'essai de toxicité des hydrocarbures. Le cadre proposé établira un lien entre le type de pétrole, les espèces mises à l'essai, l'environnement aquatique pertinent et les objectifs des essais de toxicité, comme fondement pour la sélection de paramètres d'essai précis. L'examen des méthodes comprend des conseils sur les modifications à prendre en considération pour les scénarios d'essai dans l'Arctique, dans les milieux dulcicoles, marins et estuariens, y compris les zones subarctiques et tempérées canadiennes. Les méthodes cibleront un ensemble d'espèces aquatiques canadiennes pertinentes et représentatives (y compris les stades biologiques sensibles) pour les différents scénarios d'essai. Les protocoles comprendront les essais du pétrole frais et altéré et définiront et justifieront tous les paramètres de préparation et d'exposition.
4. Établir les recherches nécessaires pour combler les lacunes dans les connaissances importantes sur les méthodes afin de déterminer le devenir, le comportement et les effets du bitume dilué dans l'eau.

En raison du long historique de recherches sur les déversements de pétrole, du très grand nombre de publications sur la toxicité du pétrole et de l'évolution des technologies pour analyser le pétrole dans l'eau, la présente analyse se limitait principalement aux études portant sur les poissons réalisées depuis 1990. La période depuis 1990 comprend de nombreux travaux de recherche effectués après le déversement de pétrole de l'*Exxon Valdez* en 1989 et l'augmentation de la demande de chimie analytique pour caractériser les solutions d'essai et associer la toxicité du pétrole à des hydrocarbures précis. Les études portant sur les poissons étaient les plus nombreuses et étaient axées principalement sur le pétrole dans l'eau, évitant ainsi les complications supplémentaires liées au pétrole dans les sédiments. En raison de contraintes de temps, cette analyse n'a pas pris en considération les études portant sur les algues et les invertébrés. Cependant, la plupart des recommandations concernant les méthodes d'essai sur les poissons, comme la préparation et l'analyse des solutions d'essai, s'appliqueront aussi aux essais de toxicité sur les invertébrés et les algues. Les recommandations relatives aux bonnes pratiques de laboratoire (BPL) devraient s'appliquer de manière générale à tout protocole d'essai. Les méthodes d'essai de toxicité des sédiments pour les poissons, les invertébrés et les algues benthiques devraient aussi être examinées dans une analyse distincte.

2 RENSEIGNEMENTS GÉNÉRAUX SUR LE BITUME DILUÉ ET LES DÉVERSEMENTS DE BITUME DILUÉ

Une analyse approfondie des ouvrages disponibles a été effectuée pour décrire l'état actuel des connaissances sur les caractéristiques, le comportement et l'impact environnemental du bitume dilué comparativement aux pétroles bruts classiques. Deux rapports se démarquent du point de vue de la portée et du champ d'application, celui du Comité d'experts de la Société royale du Canada intitulé *Le comportement et les incidences environnementales d'un déversement de pétrole brut dans les milieux aqueux* (Lee *et al.* 2015) et le rapport de la National Academy of

Sciences (NAS) des États-Unis intitulé *Spills of Diluted Bitumen from Pipelines: A Comparative Study of Environmental Fate, Effects, and Response* (NAS 2016).

Le Comité de la Société royale du Canada a examiné l'état des connaissances sur les déversements de pétrole dans l'eau douce et les eaux marines pour déterminer si cela était suffisant pour appuyer l'élaboration de « *...stratégies efficaces en matière de préparation, d'intervention et d'assainissement en cas de déversement* » (Lee *et al.* 2015). Le Comité a déterminé les besoins en matière de recherche pour appuyer l'élaboration de politiques et pratiques dans un large éventail de disciplines, y compris : la chimie, le comportement dans l'environnement et la distribution du pétrole déversé, les facteurs environnementaux propres au site qui ont une incidence sur le comportement et la distribution du pétrole, l'impact environnemental des déversements de pétrole, l'intervention en cas de déversement, les stratégies d'assainissement et leur efficacité et les méthodes et l'efficacité des ÉRÉ et des ÉIE.

Dans chaque partie du rapport de la Société royale du Canada, un accent particulier était mis sur le bitume dilué afin d'examiner si sa composition chimique et ses propriétés étaient suffisamment différentes de celles des pétroles bruts et de produits pétroliers raffinés classiques pour le considérer comme un produit unique ou simplement comme un produit faisant partie d'un continuum de compositions chimiques parmi un éventail de produits pétroliers. En général, les caractéristiques physiques et chimiques de divers bitumes dilués correspondaient à celles de pétroles lourds moyens, mais elles différaient grandement dans leur comportement lorsqu'un déversement se produisait. Plus précisément, l'altération des bitumes dilués était plus rapide que celle des pétroles classiques. Parallèlement, la viscosité et la densité augmentaient. Ce comportement était attribué à l'évaporation et à la dissolution rapides dans l'eau des hydrocarbures de faible poids moléculaire associés au composant diluant du bitume dilué. Les résultats d'une altération rapide sont une résistance accrue des hydrocarbures résiduels à la dispersion chimique, une propension accrue à couler en cas de contact avec des particules en suspension, une réduction de la létalité aiguë et une diminution du potentiel de biodégradation en raison des proportions élevées d'hydrocarbures de poids moléculaire élevé. Bien que ces propriétés soient similaires à celles d'autres pétroles lourds, le bitume dilué est exceptionnel en ce sens qu'il résiste à la formation d'émulsions d'eau dans le pétrole (mousse). Le bitume est un pétrole fortement altéré où les alkylnaphtalènes sont réduits, tandis qu'il est quelque peu enrichi dans les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) alkylés contenant trois à cinq anneaux par rapport aux pétroles bruts classiques. Par conséquent, il a un plus grand potentiel de toxicité chronique à des concentrations équivalentes d'HAP totaux. Pour mieux comprendre le comportement du bitume dilué après un déversement et améliorer les prévisions de modélisation des déversements et l'établissement de bilans massiques des déversements de pétrole, le Comité a recommandé d'élaborer des méthodes améliorées pour mesurer les processus d'altération physique, comme l'interaction avec des particules et la formation d'émulsions.

Le rapport de 2016 de la NAS mentionne des problèmes et préoccupations semblables (NAS 2016). Le Comité a conclu que les différences importantes entre le bitume dilué et les pétroles bruts classiques étaient observées au niveau « *...des propriétés de densité, de viscosité et d'adhérence exceptionnellement élevées du composant du bitume ..... qui régissent le comportement dans l'environnement, étant donné que le pétrole brut est soumis à une altération.... » [Traduction libre].* Ce changement radical des propriétés contribue à la tendance du bitume dilué altéré à couler ou à demeurer en suspension dans la colonne d'eau, principalement parce qu'il adhère facilement aux particules organiques et inorganiques. Ce changement des propriétés avec l'altération explique principalement le devenir, le comportement et la distribution du bitume dilué dans les environnements aquatiques après un déversement.

La « nature binaire » du bitume dilué déversé (c.-à-d. la différence considérable entre les états frais et altéré) est très pertinente pour le présent rapport, en ce sens que les changements des propriétés physiques, chimiques et toxicologiques avec l'altération peuvent brouiller les essais de toxicité. Il faut porter une attention particulière à la condition des échantillons de bitume dilué lorsqu'ils sont mis à l'essai et à l'interaction entre les méthodes d'essai (p. ex., un mélange prolongé qui pourrait favoriser l'altération) ainsi qu'à la toxicité mesurée. La toxicité mesurée pour les espèces aquatiques dépendra aussi bien de l'exposition aux constituants du bitume dilué dans différents scénarios d'altération que de sa toxicité inhérente.

Bien que les produits pétroliers comprennent une variété de pétroles bruts et de produits dérivés du pétrole brut, la documentation examinée désignait le plus souvent ces produits par le terme « pétrole » ou par un produit précis (p. ex., pétrole brut Alaska North Slope ou ANSC) et ces termes généraux et précis seront utilisés tout au long de la présente analyse.

2.1 PROPRIÉTÉS PHYSIQUES ET CHIMIQUES DES PRODUITS DU BITUME DILUÉ

Il existe toute une gamme de caractéristiques physiques et chimiques du bitume dilué et elles sont définies par les mêmes termes que ceux utilisés pour les pétroles bruts classiques. Le bitume dilué est un mélange de bitume extrait des sables bitumineux dilués avec des condensats de pétrole et de gaz.

Selon Yang *et al.* (2011), les « *sables bitumineux sont un mélange de 4 % à 6 % d'eau, de 83 à 85 % de sédiments hôtes (sables, autres matières minérales) et de 10 % à 12 % de bitume* ». Le composant du bitume est un pétrole lourd (densité API généralement < 10°; Speight 2006), semi-solide à température ambiante et qui contient une proportion élevée d'asphaltènes et de résines et une faible proportion de paraffines et de naphtalènes de poids moléculaire plus faible comparativement aux pétroles classiques (Yang *et al.* 2011). Les différences proportionnelles dans les composants de poids moléculaire élevé et faible sont à l'origine de la viscosité élevée du bitume par rapport à d'autres produits pétroliers. En réponse, la « valorisation » (synbit) ou la dilution du bitume est nécessaire pour réduire la viscosité et faciliter sa manipulation et son transport.

Le bitume dilué et d'autres pétroles peuvent être répartis en saturés, aromatiques, résines et asphaltènes (SARA). Yoon *et al.* (2009) ont déclaré qu'un échantillon de bitume d'Athabasca était composé de 67,97 % de saturés et d'aromatiques, de 15,59 % d'asphaltènes et de 16,44 % de résines. Ces taux varient en fonction de l'emplacement de la source et de la profondeur d'extraction du bitume (Yoon *et al.* 2009). La composition et le degré de biodégradation des dépôts de bitume dans l'ouest du Canada varient entre les dépôts et à l'intérieur de ceux-ci (Brooks *et al.* 1988).

Les saturés et les aromatiques dans les pétroles bruts et autres pétroles sont normalement caractérisés par une analyse par chromatographie en phase gazeuse, telle que présentée par Yang *et al.* (2011). Les pétroles bruts présentent généralement plusieurs pics marqués indéterminés sur un chromatogramme, qui donnent lieu à des alcanes saturés précis, notamment les *n*-alcanes. Le chromatogramme présente aussi normalement une « bosse » (ou des bosses) indiquant un mélange complexe indéterminé ou d'autres composés, notamment des alcanes biodégradés, des alcanes cycliques et ramifiés de poids moléculaire plus élevé, des hydrocarbures aromatiques polycycliques, y compris les versions alkylées et certains hétéroatomes contenant des dérivés d'alcane et des composés aromatiques. Dans le cas du pétrole brut analysé par Yang *et al.* (2011), le chromatogramme est dominé par les pics marqués et déterminés, tandis que la bosse indiquant un mélange complexe indéterminé peut être considérée comme une caractéristique mineure. En revanche, les chromatogrammes

d'échantillons de bitume extrait des sables bitumineux comprenaient principalement deux bosses indiquant un mélange complexe indéterminé et seulement des pics marqués mineurs se chevauchant, indiquant que les alcanes individuels, en particulier les alcanes de poids moléculaire plus faible et les *n*-alcanes, disparaissaient des pétroles bruts d'origine pendant la formation du bitume, probablement par la biodégradation (Yang *et al.* 2011). Le chromatogramme du bitume dilué ressemble à un mélange des chromatogrammes du bitume et des pétroles bruts. Le profil du mélange complexe indéterminé est presque identique à celui d'un échantillon de bitume, mais des pics marqués déterminés sont observés en plus du mélange complexe indéterminé. Cela est attendu lorsque les alcanes individuels fournissant les pics marqués proviennent de composants présents dans le diluant, ce qui correspond généralement à un pétrole brut très léger.

Le bitume a des niveaux beaucoup plus élevés de composés aromatiques par rapport aux pétroles bruts classiques (Yang *et al.* 2011). Cela signifie que les bitumes dilués auront aussi des compositions aromatiques plus élevées si la teneur en aromatiques du diluant ressemble à celle des pétroles bruts. Le bitume a de faibles niveaux de naphtalènes de faible poids moléculaire (C_0- à C_3-naphtalènes) et pour d'autres groupes d'HAP, une tendance dans les homologues alkyles est observée où $C_3 > C_2 > C_1$. Cela est attribuable au fait que les HAP plus alkylés et de poids moléculaire plus élevé sont moins sujets à la biodégradation. Les pétroles bruts sont généralement dominés dans les HAP totaux par les naphtalènes, y compris les C_0- à C_3-naphtalènes, et présentent une tendance pour d'autres HAP où la proportion la plus élevée est C_1 ou C_2. La nature hybride du bitume dilué apparaît clairement dans le profil des naphtalènes qui ressemble à celui du diluant, tandis que le profil des autres groupes d'HAP ressemble généralement à celui du bitume (Yang *et al.* 2011). Les terpènes et adamantanes du bitume dilué, connus pour résister à la biodégradation, ont aussi un profil similaire à celui du bitume (Yang *et al.* 2011).

2.1.1 Comparaison des propriétés du bitume dilué à celles des pétroles bruts classiques

Les propriétés physiques et chimiques du bitume dilué varient plus largement que celles des pétroles bruts classiques. Les caractéristiques des mélanges dépendent de la source du bitume et des méthodes d'extraction, du type de diluant, du ratio diluant/bitume et de l'état d'altération. La densité API, la densité et l'adhérence du bitume dilué se distinguent de celles du pétrole brut classique (Tableau 1). La densité API (mesurée en degrés API) est une mesure de la densité par rapport à l'eau (c.-à-d. l'inverse d'une densité spécifique) introduite par l'American Petroleum Institute pour comparer différents produits pétroliers. La densité API de l'eau douce est 10°. Les pétroles légers ont des densités API > 31,1°, les pétroles moyens ont une densité comprise entre 22,3°et 31,1 — et les pétroles lourds ont une densité < 22,3 — (Speight 2014). La densité API du mazout lourd est comprise entre 5 et 15 — (Tableau 1). En ce qui concerne l'adhérence, un produit du bitume dilué, l'Access Western Blend (AWB) présente un profil d'adhérence similaire à celui des mazouts.

Tableau 1 : Caractéristiques physiques des hydrocarbures (modifiées à partir de Fingas (2001) et de POLARIS [2013]).

Propriété	Unités	Type d'hydrocarbures							
		Essence	Diesel	Brut léger	Bitume dilué[1]	Brut lourd	Mazout intermédiaire	Bunker C	Émulsion de pétrole brut
Densité	Kg/m^3 à 15 °C	720	840	780 à 880	824 à 941	880 à 1 000	940 à 990	960 à 1 040	950 à 1 000
Densité API	°	65	35	30 à 50	18 à 39	10 à 30	10 à 20	5 à 15	10 à 15

Propriété	Unités	Type d'hydrocarbures							
		Essence	Diesel	Brut léger	Bitume dilué[1]	Brut lourd	Mazout intermédiaire	Bunker C	Émulsion de pétrole brut
Viscosité	MPa à 15 °C	0,5	2	5 à 50	270,5* à 265 263 **	50 à 50 000	1 000 à 15 000	10 000 à 50 000	20 000 à 100 000
Point d'éclair	15 °C	-35	45	-30 à 30	< -35**[m] à 58*[m]	-30 à 60	80 à 100	> 100	> 80
Solubilité dans l'eau	ppm	200	40	10 à 50	–	5 à 30	10 à 30	1 à 5	–
Point d'écoulement	°C	NC	-35 à -1	-40 à 30	-30**[m] à 15**[m]	-40 à 30	-10 à 10	5 à 20	> 50
Tension superficielle	mN/m à 15 °C	27	27	10 à 30	27*[m] à 150*[m]	15 à 30	25 à 30	25 à 35	–

[1]Les valeurs fournies comprennent le bitume dilué altéré provenant d'essais; NP = non pertinent; *Calculé pour l'AWB; **Valeur calculée pour le CLB; *[m]Valeur mesurée de l'AWB; **[m]Valeur mesurée du CLB

Les bitumes dilués se distinguent aussi des pétroles bruts classiques de par leur composition en SARA. Yang *et al.* (2011) ont procédé à un relevé des sables bitumineux de l'Alberta, du bitume dilué, du pétrole synthétique et du pétrole brut classique et ont déterminé que le bitume et le bitume dilué peuvent se distinguer de la plupart des pétroles bruts selon leur composition, y compris la distribution des HAP homologues, les *n*-alcanes, le mélange complexe indéterminé et les biomarqueurs terpènes et adamantanes (Yang *et al.* 2011). Plus particulièrement, l'augmentation proportionnelle des HAP homologues avec le degré d'alkylation diffère de la distribution en cloche habituelle des pétroles bruts classiques, avec une proportion plus élevée de congénères plus alkylés dans le bitume dilué (Yang *et al.* 2011). Les HAP les plus abondants dans les pétroles bruts classiques sont les C_0- à C_4-naphtalènes alkylés. Ils sont aussi abondants dans les produits du bitume dilué en raison de l'ajout d'un diluant, mais la proportion d'HAP totaux est relativement faible dans le bitume. POLARIS (2013) a déclaré que la fraction d'HAP dans le bitume dilué est similaire à celle des pétroles bruts et inférieure à celle des mazouts intermédiaires.

Comme avec les pétroles bruts classiques, le bitume dilué subit des modifications physiques et chimiques avec les processus d'altération après un déversement. Les composés volatils de faible poids moléculaire disparaissent rapidement et l'adhérence change le plus dans les 24 premières heures suivant un déversement, avec peu de changements dans les 280 heures qui suivent. En revanche, il existe une correspondance linéaire entre l'adhérence et le temps d'altération pour les pétroles bruts légers (Hollebone 2015 et données inédites d'ECCC mentionnées dans Lee *et al.* 2015). Les mécanismes d'altération, la vitesse du changement et le degré de changement sont déterminés par la composition du pétrole et par les conditions de l'environnement. Cependant, l'altération du bitume dilué se distingue de celle d'autres pétroles. L'altération du bitume dilué se produit sur une échelle temporelle plus courte en raison de la perte rapide du diluant. Cela signifie aussi que les modifications des caractéristiques physiques du bitume dilué avec l'altération, p. ex. une densité accrue, surviennent plus rapidement que pour les pétroles bruts. La proportion de pétrole perdu lors de l'altération est plus faible que pour d'autres pétroles et l'état altéré final est similaire à celui du composant du bitume d'origine (NAS 2016). En raison de la modification des caractéristiques du bitume dilué lorsqu'il est altéré, le Comité de la NAS (2016) a recommandé que la Garde côtière des États-Unis change sa classification des produits du bitume dilué pour souligner sa tendance à couler.

2.2 EXAMEN DES DÉVERSEMENTS DE PRODUITS DU BITUME DILUÉ

Les produits du bitume dilué sont transportés dans tout le Canada par 'pipeline, par camion et par train, et depuis la côte par pétrolier. Avec les propositions de nouveaux pipelines pour transporter le bitume dilué de l'Alberta vers les marchés internationaux depuis les côtes Ouest et Est, le risque de déversements dans les écosystèmes d'eau douce augmente. Le mode et la voie de transport contribuent grandement aux risques de déversement de bitume dilué, y compris la durée du déversement, le volume total du déversement et la faisabilité d'une intervention et d'un nettoyage rapides. Les produits du bitume dilué s'écoulent plus facilement à des températures plus basses et se dispersent plus que le bitume non dilué ou le bitume chauffé qui refroidirait plus rapidement lorsqu'il est déversé. L'altération évaporative, la dissolution des composants hydrosolubles, l'absorption de matières solides et d'eau, la biodégradation, l'émulsification et la photooxydation influeront également sur le devenir du bitume dilué déversé (Dew *et al.* 2015).

Le comportement d'immersion des produits du bitume dilué fait l'objet de discussions. Comme avec les produits pétroliers et les pétroles synthétiques des groupes III et IV, l'immersion du bitume dilué dépend des conditions environnementales (POLARIS 2013) et de la composition chimique, de la densité, de la volatilité, de la viscosité ainsi que du point d'écoulement. La teneur en cire et asphaltènes pourrait influer sur la capacité de former des émulsions d'eau dans le pétrole et la teneur en asphaltènes et résines exerce une influence sur la formation de boules de goudron (POLARIS 2013). Compte tenu de ces caractéristiques, le bitume dilué pourrait couler ou former des boules de goudron pendant la préparation de solutions pour les essais de toxicité, en fonction du protocole de mélange. Il n'y a pas encore eu de rapports indiquant que ces comportements ont eu une incidence sur les essais de toxicité en laboratoire, mais on a observé que le bitume dilué coulait après un déversement dans le ruisseau Talmadge et dans la rivière Kalamazoo, Michigan. Le 25 juillet 2010, une rupture de deux mètres dans le pipeline n° 6B d'Enbridge a entraîné le déversement de 27 000 barils de bitume dilué dans le ruisseau Talmadge, Michigan (Brooks 2014). Le déversement s'est produit à la fin d'un lot de Western Canadian Select (WCS) et au début d'un lot de Cold Lake Blend (CLB). Le déversement de pétrole a été estimé ainsi : 77,5 % de CLB et 22,5 % de WCS (Enbridge Energy 2013).

Brooks (2014) a fourni un résumé du déversement :

- Déversement de bitume dilué sur la terre aux endroits où les sols saturés par les fortes pluies lui permettaient d'atteindre le ruisseau Talmadge, puis la rivière turbide Kalamazoo à courant rapide.
- Pendant l'inondation, les nappes de pétrole ont été brisées par la végétation et, dans le cours d'eau, l'entraînement et la sédimentation du pétrole ont été observés. Lorsque le niveau d'eau a diminué en passant d'un niveau inférieur à celui de la plaine d'inondation à des niveaux constatés avant l'inondation, du pétrole avait échoué sur la végétation, dans les macropores remplis de pétrole (définies par Brooks [2014] comme *« des traces de racines et des terriers d'animaux susceptibles d'emprisonner le pétrole et de contaminer sous la surface »*) et sur la terre. Du pétrole était déposé dans les sédiments de lits de rivières et des irisations se formaient sur la surface de l'eau lorsqu'il flottait librement.
- L'altération évaporative plus rapide que prévu pendant le déplacement et l'intégration de matières particulaires, sur la terre et dans la colonne d'eau, ont donné lieu à plusieurs impacts environnementaux du bitume dilué dans l'eau, y compris la flottaison, la submersion et l'immersion.
- Les récepteurs de plusieurs habitats du réseau hydrographique ont été perturbés.

Après les premières semaines de nettoyage du pétrole flottant, l'accent a été mis sur la récupération du pétrole submergé (FOSC 2016), indiqué par l'émergence spontanée de globules de pétrole ou lorsque les sédiments étaient perturbés (Enbridge Energy 2013). Les estimations de la quantité de pétrole restant dans les sédiments diffèrent entre Enbridge et l'USEPA et varient de 19 000 à 181 000 gallons (FOSC 2016).

Au Canada, le plus grand déversement dans les terres d'un produit du bitume à ce jour a été la rupture du pipeline de Nexen Energy à Long Lake, en Alberta, le 15 juillet 2015. Une défaillance de la sécurité intégrée du pipeline a entraîné le déversement de 31 000 barils d'une émulsion de bitume (environ 33 % de pétrole), d'eau et de sable (Prystupa 2015) qui a recouvert environ 21 900 m^2 (Nexen 2015). L'excavation du bitume déversé à partir du site a été effectuée le 19 avril 2016, mais il n'y a pas eu d'articles de journaux ou de rapports récents sur les évaluations d'impact.

De même, le devenir et l'effet d'environ 1 572 barils de pétrole lourd (n'étant pas du bitume dilué) déversés dans la rivière Saskatchewan Nord depuis un pipeline de Husky Energy entre 20 h, le 20 juillet et 6 h, le 21 juillet 2016 (Nickel et Williams 2016) n'ont pas encore été déclarés publiquement. Le type de pétrole déversé était du pétrole brut lourd appelé HLU Blended LLB (Saskatoon Star Phoenix: Crews unlikely to recover all the spilled crude: Ministry of Environment). Les courants rapides de la rivière Saskatchewan Nord ont déplacé le pétrole rapidement en aval, jusqu'à 500 km le 28 juillet (Cotter 2016), et deux municipalités ont été contraintes à couper leur prise d'eau potable (McSheffrey 2016). Le déversement de pétrole s'étant produit pendant une période de fortes pluies, il était prévu que le pétrole se déposerait sur les herbes et la végétation du littoral (CBC 2016a). La quantité de débris dans l'eau a aussi augmenté le potentiel d'interactions du pétrole avec les débris en suspension dans la colonne d'eau (McSheffrey 2016), mais en septembre 2016, aucun rapport détaillé sur la contamination des sédiments ou aucune ÉIE n'existait. Cependant, Ricardo Segovia, un hydrogéologue, a signalé que le pétrole s'était déposé dans le fond de la rivière (CBC News: More calls for transparency in the aftermath of Husky oil spill), ce qui reflèterait l'expérience lors du déversement de 2010 dans la rivière Kalamazoo.

Le 30 juillet, il ne restait aucun pétrole flottant sur l'eau et le pétrole sur les berges avait été emporté dans l'eau aux fins de ramassage et de nettoyage. Les huiles résiduelles ont été décrites comme « très épaisses et visqueuses ». Ed Owens a déclaré que le pétrole déversé « est un pétrole flottant » et que tous les échantillons prélevés jusqu'à présent n'indiquent pas que le pétrole s'est associé à des matériaux du lit, bien qu'aucune description des types d'échantillons ou de lieux d'échantillonnage n'ait été fournie (CBC 2016b).

2.2.1 Examen des scénarios d'exposition dans les déversements de bitume dilué

Comme avec d'autres types de pétrole, le bitume dilué flottant peut être recueilli depuis la surface de l'eau, ce qui présente une exposition plus faible pour les espèces aquatiques. On se préoccupe de plus en plus des répercussions des déversements lorsque le pétrole est submergé dans la colonne d'eau et persiste. Les produits du bitume dilué sont particulièrement préoccupants en raison de l'altération rapide et du comportement d'immersion du bitume dilué (Dew *et al.* 2015), comme le démontre le déversement de 2010 dans la rivière Kalamazoo. Les conditions particulières du comportement d'immersion du bitume dilué dans l'eau douce ont été déterminées grâce à des essais en laboratoire (examen, Dew *et al.* 2015). Dans un rapport, le bitume dilué était ajouté à de l'eau douce à 15 °C dans un réservoir de laboratoire avec des vents faibles (S.L. Ross 2012) et altéré pendant onze jours jusqu'à une densité légèrement inférieure à celle de l'eau douce. Aucun signe d'écoulement n'a été démontré. Dans les mêmes conditions, mais avec une exposition aux rayons UV, des gouttelettes de bitume dilué ont été observées dans les 10 cm supérieurs de la colonne d'eau, probablement en raison de

changements chimiques qui avaient une incidence sur la tension superficielle. Cependant, il n'y avait aucun signe d'immersion du bitume dilué. En revanche, dans des conditions semblables, la présence de particules organiques ou inorganiques dans l'eau était associée à la précipitation du bitume dilué dans le fond des récipients d'essai (GC 2013), ce qui correspondait à son comportement dans la rivière Kalamazoo (Dew *et al.* 2015). Les études menées dans un canal d'essai sur l'ajout de l'AWB dans l'eau saumâtre filtrée (salinité de < 17 ppm) à 19 °C ont démontré que l'altération dans des conditions de faible énergie dépourvues de particules en suspension supérieures à 5 µm entraînait l'immersion des gouttelettes de pétrole dans un délai de sept jours (King *et al.* 2014). Les auteurs ont émis l'hypothèse que l'AWB altéré coulerait dans l'eau douce dans des conditions semblables.

Compte tenu du comportement d'immersion observé du bitume dilué, le bitume dilué déversé persistera s'il n'est pas immédiatement récupéré, augmentant le risque d'expositions chroniques des organismes benthiques aux hydrocarbures. Dans les milieux marins, le pétrole classique flotte habituellement sur l'eau, se disperse sur la surface et peut être dispersé mécaniquement par le vent et les vagues ou être récupéré. Le bitume dilué devrait aussi flotter, car la densité de l'eau de mer est supérieure à celle de l'eau douce. Cependant, la turbidité dans les estuaires des rivières et dans les eaux à proximité des côtes pourrait fournir une source de particules qui faciliterait l'immersion. Compte tenu de la possibilité d'immersion, des recherches sont nécessaires pour élaborer des méthodes normalisées afin d'évaluer la toxicité du bitume dilué intégré dans les sédiments.

Le comportement du bitume dilué pourrait aussi avoir une incidence sur l'efficacité de la dispersion chimique après des déversements en mer (Lee *et al.* 2015). Les pétroles altérés sont moins sujets à la dispersion chimique que les pétroles frais. En raison de l'altération rapide, la période propice à la dispersion chimique du bitume dilué sera plus courte que celle des pétroles bruts classiques. L'intervalle pendant lequel des agents dispersants peuvent être utilisés sera aussi déterminé par les conditions environnementales propres au site (p. ex., la température, la vitesse du vent, la turbulence des vagues) qui ont une incidence sur la vitesse d'altération du bitume dilué.

2.2.2 Établir un lien entre le comportement observé du bitume dilué dans les déversements et les méthodes d'essai de toxicité

Bien qu'il y ait peu de documentation quant aux études sur le terrain sur les déversements de bitume dilué, il est évident que le comportement environnemental et le devenir du bitume dilué changent rapidement avec l'altération et l'interaction avec les particules. Ces changements sont très pertinents pour les essais de toxicité, ainsi que les comparaisons de la toxicité entre le bitume dilué dispersé chimiquement et le bitume dilué dispersé mécaniquement. Les protocoles publiés pour préparer les solutions d'essai impliquent de mélanger le pétrole et l'eau pendant 18 heures (WAF) et avant d'ajouter l'agent dispersant (CEWAF) (p. ex., Wu *et al.* 2012). L'augmentation de la viscosité du bitume dilué au cours des 18 heures de brassage peut réduire énormément la séparation des hydrocarbures du bitume dilué dans l'eau et l'efficacité des agents dispersants chimiques. Il est extrêmement important de prendre en considération ces caractéristiques des produits du bitume dilué au moment de concevoir le mélange huile-eau, car elles auront une incidence sur les résultats des essais de toxicité et sur la perception des risques par rapport aux déversements de produits pétroliers classiques.

Besoin en matière de recherche

- Il est nécessaire d'effectuer des recherches sur les durées de mélange optimales pour la dispersion chimique la plus efficace et les essais de toxicité du bitume dilué les plus reproductibles. Cette recommandation s'applique à tous les pétroles.
- Élaborer des méthodes normalisées pour évaluer la toxicité du bitume dilué incorporé dans les sédiments.

3 RENSEIGNEMENTS GÉNÉRAUX SUR LES ESSAIS DE TOXICITÉ AVEC LE PÉTROLE

Le rapport de 2015 de la Société royale du Canada (Lee *et al.* 2015) comprenait un examen des effets de l'exposition au pétrole sur le biote aquatique, facteurs qui avaient une incidence sur les mesures de la toxicité, et de l'utilité des données sur la toxicité publiées pour les ÉRÉ et les ÉIE. Reconnaissant que les essais de toxicité sont censés être des essais contrôlés dans le cadre desquels la seule variable est une série classifiée de concentrations d'hydrocarbures, le rapport détermine une série d'hypothèses qui, si elles sont enfreintes, réduiraient la précision des estimations de la toxicité et leur application dans les ÉRÉ et les ÉIE (Encadré 1). Ces hypothèses ont rarement été mises à l'essai ou abordées dans la documentation examinée, ce qui indique que la plupart des données sur la toxicité publiées comprennent des incertitudes

Encadré 1.
Hypothèses concernant les essais de toxicité des hydrocarbures
(adaptées de Lee *et al.* [2015] p. 171)

- Toutes les variables d'essai sont constantes, à l'exception d'une série croissante de concentrations d'hydrocarbures.
- Les concentrations d'hydrocarbures dans les solutions d'essai augmentent proportionnellement avec la quantité de pétrole ajoutée.
- Les hydrocarbures sont librement dissous dans les solutions d'essai.
- Les concentrations sont connues et constantes pendant l'essai.
- Les proportions relatives d'hydrocarbures demeurent constantes au fil du temps et dans les concentrations d'essai.
- Les organismes mis à l'essai réagissent uniquement aux hydrocarbures pétroliers.

importantes qui réduisent leur précision et leur utilité pour les ÉRÉ et les ÉIE.

Les principaux enjeux et besoins en matière de recherche déterminés étaient les suivants :

- Concentrations variables en fonction du temps : Changements importants et rapides des concentrations et de la composition des hydrocarbures pétroliers pendant les essais de toxicité (voir la section 4.4.5).
- Manque de données sur les constantes d'absorption et de dépuration des hydrocarbures pétroliers pour appuyer la modélisation d'une dose interne associée à des concentrations variables en fonction du temps.

- Accent mis sur les effets d'expositions aiguës (24 à 96 heures) aux hydrocarbures et moins de données sur les expositions prolongées ou chroniques propres aux scénarios de déversement, comme le déversement de pétrole de la plateforme Deepwater Horizon (DWH) ou les déversements de pétrole provenant de pipelines.
- Peu de données sur les réactions prolongées ou retardées à des expositions à court terme, sur les répercussions sur le rendement physiologique (p. ex., la performance natatoire en tant qu'élément clé de l'alimentation, l'évitement des prédateurs et les migrations de reproduction) et sur les répercussions sur la croissance à long terme, la reproduction et sur les taux de maladie et de survie.
- Nécessité d'une caractérisation chimique détaillée des solutions d'essai pour décrire les concentrations variables en fonction du temps et pour déterminer les composants individuels qui pourraient être à l'origine d'une toxicité aiguë et chronique.
- Nécessité de méthodes analytiques rapides et rentables pour appuyer les caractérisations chimiques détaillées des éléments suivants :
  - Hydrocarbures pétroliers dans les solutions d'essai
  - Composants d'agents dispersants chimiques (p. ex., le dioctylsulfosuccinate de sodium [DOSS] dans le Corexit 9500) pour comprendre le rôle et l'importance relative de la toxicité d'agents dispersants ou de la toxicité interactive de mélanges d'agents dispersants et de pétrole.
  - Gouttelettes dans les solutions d'essai pour décrire la distribution par taille des gouttelettes associées à différentes méthodes de préparation de solutions de pétrole dans l'eau.
- Nécessité de méthodes d'échantillonnage qui permettent de distinguer les phases « dissoutes » des phases « particulaires » dans les solutions d'essai pour aider à mieux comprendre la biodisponibilité et la toxicité relatives des hydrocarbures aux phases dissoute et liquide.
- Conceptions d'expériences qui représentent le large éventail de scénarios d'exposition dans l'eau douce et l'eau de mer, dans les lacs, les rivières et les zones humides, et dans les eaux arctiques sujettes à des déversements brefs ou continus.
- Reconnaissance du fait que les résultats des essais de toxicité dépendent beaucoup des méthodes utilisées pour mélanger le pétrole et l'eau ou le pétrole, l'eau et les agents dispersants chimiques. Les méthodes élaborées pour représenter un scénario d'exposition propre au site pourraient ne pas s'appliquer à de nombreux autres scénarios de déversement. Les caractéristiques de chaque pétrole sont uniques, tout comme les caractéristiques écologiques et les conditions environnementales dans lesquelles le pétrole est déversé.

Les enjeux déterminés par le rapport du Comité de la Société royale du Canada sont revus plus en détail dans le chapitre 4 du présent rapport.

3.1 BRÈVE INTRODUCTION AUX ESSAIS DE TOXICITÉ AQUATIQUE

Les essais de toxicité aquatique permettent d'évaluer les dangers des produits chimiques ou des mélanges de produits chimiques dans l'eau. Ils fournissent des données pour prédire les effets des expositions environnementales et comparer les toxicités relatives entre les hydrocarbures, les espèces aquatiques et les conditions d'essai. Selon la *Section de l'élaboration et de l'application des méthodes* d'Environnement et Changement climatique Canada (rapport SPE 1/RM/9 avec les modifications de mai 2007) un « *essai de toxicité est la détermination de l'effet d'une substance sur un groupe d'organismes sélectionnés, dans des*

conditions définies ». L'essai idéal portera sur un éventail de concentrations, générera une variation des effets et décrira une relation exposition-réaction reproductible.

Les composants importants des protocoles d'essai et la nécessité de normalisation ont d'abord été indiqués par Doudoroff *et al.* (1951) pour les essais de toxicité d'effluents industriels. Le manuel *Aquatic Toxicology* (Rand 1995) contient un examen approfondi des méthodes d'essai et des variables à prendre en considération lors de leur conception et de leur exécution (Cooney 1995; Rand *et al.* 1995; Sprague 1995; Ward 1995). Sprague (1969; 1970; 1971) examine aussi en détail bon nombre de principes et de conditions d'essai qui influent sur les résultats des essais de toxicité utilisant des poissons. Les conditions d'essai recommandées par ces auteurs constituent les « pratiques exemplaires » et sont prises en considération dans les protocoles d'essai publiés (p. ex., Environnement Canada 1998, 2007, 2011).

La normalisation des méthodes d'essai permet à plusieurs praticiens ayant divers niveaux de compétence de générer des données comparables et uniformes pour assurer une surveillance régulière (Davis 1977). Le processus de normalisation des méthodes d'essai a été décrit par Davis (1977) et comprenait un équilibre entre la stricte description des détails et la valeur pratique et la pertinence des résultats d'essai. Les méthodes peuvent être trop normatives, ce qui rend leur application fastidieuse, peu pratique et rigide dans de nouvelles circonstances, ou peuvent ne pas être suffisamment détaillées pour qu'il soit possible de les répliquer. Les avantages et les inconvénients de la normalisation varient selon les objectifs de l'essai. Par exemple, des méthodes normatives détaillées sont bénéfiques pour l'approbation réglementaire des produits chimiques, mais elles pourraient être trop restrictives pour les essais de toxicité utilisés dans les recherches ou non pertinentes pour les conditions environnementales d'un déversement réel (Davis 1977). Rand (1995) a décrit les critères qui pourraient être utilisés "pour évaluer une étude afin de déterminer s'il doit s'agir d'un essai standard, notamment si l'essai proposé est : largement accepté, reproductible, facile à mener, rentable, sensible et s'il peut être utilisé dans une ÉRÉ.

L'élaboration de méthodes d'essai et de lignes directrices a augmenté la reproductibilité et la comparabilité des résultats d'essai. De telles lignes directrices sont établies et diffusées par plusieurs groupes, y compris Environnement et Changement climatique Canada (ECCC), l'Environmental Protection Agency des États-Unis (USEPA), l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE), l'Organisation internationale de normalisation (ISO), l'American Public Health Association (APHA) et l'American Society for Testing and Materials (ASTM).

La présente analyse est axée sur les méthodes d'essai de toxicité aquatique utilisant le poisson pour lesquelles il existe plusieurs méthodes et documents d'orientation. Par exemple, les méthodes d'essai biologique d'ECCC comprennent un essai de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel (SPE 1/RM/09), un essai de létalité aiguë sur l'épinoche à trois épines (*Gasterosteus aculeatus*) (SPE 1/RM10), une méthode de référence pour la détermination de la létalité aiguë des effluents chez la truite arc-en-ciel (SPE 1/RM13), un essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule (SPE 1/RM22) et des essais de toxicité sur des salmonidés (truite arc-en-ciel) aux premiers stades de leur cycle biologique (SPE 1/RM28).

3.2 MÉTHODES STANDARDS UTILISÉES DANS LES ESSAIS DE TOXICITÉ DU PÉTROLE

La conception des essais de toxicité dépendra du but et des objectifs de l'essai. Un tel objectif est de fournir des données sur la toxicité d'une qualité suffisante pour appuyer les ÉRÉ des déversements de pétrole, en particulier du bitume dilué, dans les écosystèmes aquatiques dans différentes conditions environnementales. Les méthodes d'essai standards peuvent aussi être

utilisées pour appuyer l'assainissement, l'évaluation d'impact, la recherche et les exigences réglementaires et juridiques.

Le défi lié à l'élaboration de méthodes standards pour le pétrole est que de nombreuses méthodes ont été élaborées pour des composés uniques ou pour des effluents liquides contenant des composés hydrosolubles. Cependant, les pétroles bruts et raffinés sont des mélanges complexes de composés dont la solubilité dans l'eau et la volatilité varient. En outre, la composition de chaque pétrole est unique, en fonction de son type, de sa source et de ses additifs (CONCAWE 1993). Il est impératif que les méthodes élaborées pour les substances hydrosolubles soient modifiées pour tenir compte des propriétés du pétrole (Rufli *et al.* 1998).

Girling (1989) a examiné diverses méthodes pour produire des solutions aqueuses destinées aux essais portant sur des produits pétroliers. L'analyse décrivait deux types de solutions : solutions du milieu « complètes » qui contiennent du pétrole en vrac, qui incluaient une dispersion ou émulsion chimique, une dispersion à grande énergie et une dispersion à faible énergie, et solutions du milieu « fractionnelles » dans lesquelles la phase aqueuse contient du pétrole dispersé et dissous. Les méthodes pour préparer les solutions variaient grandement et comprenaient des ratios pétrole/eau dans l'eau de mer allant de 1:18 à 1:1 000, des durées de mélange de 4 à 240 heures et des temps d'établissement de 0 à 4 heures. Girling (1989) a déterminé plusieurs facteurs qui influent sur la composition des milieux d'essai, notamment les propriétés du produit, l'environnement de mélange, la qualité de la phase aqueuse, les propriétés des composants dans le mélange de pétrole et les ratios pétrole/eau.

De même, LaRoche *et al.* (1970) ont recommandé la normalisation de la température de l'eau contenant le diluant, du pH, de la salinité (eau de mer synthétique préparée avec de l'eau du robinet), de l'oxygène dissous, des méthodes de mélange ainsi que l'utilisation de substances toxiques de référence pour pouvoir comparer les études portant sur le pétrole dispersé. Les facteurs supplémentaires déterminés qui ont une incidence sur la composition des solutions d'essai étaient le type de pétrole, la durée du mélange et la température (Maher 1982), ainsi que les ratios pétrole/eau et la présence de pétrole particulaire (Maher 1986). Bon nombre de recherches sur les agents dispersants, le pétrole et la toxicité du pétrole dispersé ont depuis été menées avec différentes méthodes d'essai de toxicité et différents étalons d'analyse. Cependant, les propriétés des solutions d'essai énumérées ci-dessus sont rarement mesurées, ce qui limite la comparabilité des résultats entre les laboratoires, les pétroles et les espèces (Singer *et al.* 2000, 2001a). Ainsi, la toxicité mesurée semble dépendre en grande partie des caractéristiques de l'essai. Compte tenu de la complexité du pétrole et du nombre de facteurs dans la conception des essais de toxicité, il n'est pas surprenant de constater des écarts entre les résultats d'essais de toxicité (Singer *et al.* 2001a).

3.3 NOMENCLATURE

Seule une petite portion des études examinées dans ce rapport ont mesuré la toxicité de plusieurs pétroles. Par conséquent, les comparaisons de la toxicité entre les pétroles, les espèces ou les conditions environnementales impliquent des comparaisons entre des publications qui utilisent différentes méthodes. Un principal obstacle à de telles comparaisons est le manque de terminologie normalisée qui correspond aux méthodes utilisées et il est indispensable de déclarer les détails des expériences en utilisant une terminologie normalisée de manière uniforme. La terminologie utilisée tout au long de la présente analyse est conforme au CROSERF (section 3.3.3). Parmi les 144 publications examinées, il y avait 54 descriptions ou termes distincts pour les 223 solutions ou méthodes déclarées, y compris les révisions de termes couramment utilisés, la plupart d'entre elles étant des variantes de quelques termes principaux (Tableau 2). La fréquence à laquelle les principaux termes étaient utilisés dans les publications est illustrée sur la figure 1.

Tableau 2 : Liste des termes couramment utilisés

Terminologie	Description	Termes[1] connexes déclarés dans la documentation
Fraction adaptée à l'eau (**WAF**)	Générée par un mélange à faible énergie de pétrole flottant sur l'eau, avec peu de perturbations de la nappe de surface. Les solutions d'essai contiennent des hydrocarbures dissous et éventuellement une petite fraction de pétrole particulaire.	Solutions LEWAF, MEWAF, HEWAF — Solution WAF préparée par un mélange à faible, moyenne ou grande énergie Solution BEWAF — Fraction adaptée à l'eau améliorée biologiquement Solution BWWAF — Fraction adaptée à l'eau des vagues déferlantes Fraction adaptée à l'eau du pétrole brut brûlé Fraction adaptée à l'eau du pétrole brut
Fraction hydrosoluble (**WSF**)	Fraction adaptée à l'eau qui a été filtrée ou traitée pour supprimer toutes les gouttelettes de pétrole et qui contient uniquement des « fractions véritablement solubles de chaque pétrole mis à l'essai », selon la description donnée par Anderson *et al.* (1974).	Fraction adaptée à l'eau du carburant diesel Fraction adaptée à l'eau — Fraction hydrosoluble du carburant diesel WSF du WCO — Fraction hydrosoluble du pétrole brut entier WSFd — Fraction hydrosoluble du bitume dilué Doses de fractions hydrosolubles
Fraction adaptée à l'eau améliorée chimiquement (**CEWAF**)	Générée par une dispersion mécanique et chimique du pétrole flottant. Les solutions d'essai contiennent des hydrocarbures dissous et une quantité importante de pétrole particulaire.	Fraction adaptée à l'eau du pétrole et de l'agent dispersant HECEWAF – Fraction adaptée à l'eau améliorée chimiquement à grande énergie
Pétrole dispersé	Pétrole particulaire dispersé mécaniquement ou chimiquement	DO – Pétrole dispersé WAF DO – WAF de pétrole dispersé DCO – Pétrole brut dispersé DCWAF – WAF de pétrole brut dispersé DWAF – WAF dispersée CD – Dispersions chimiques CDO – Pétrole dispersé chimiquement MDO – Pétrole dispersé mécaniquement

1 Note de l'éditeur : les acronymes présentés ici correspondent aux acronymes tels qu'utilisés dans les publications.

La possibilité de confusion était évidente tout au long de la présente analyse documentaire. De nombreuses nuances dans la terminologie ont été utilisées pour décrire les solutions pétrole/eau ou les méthodes utilisées pour préparer les solutions. Les termes utilisés ne se rapportaient pas toujours à la solution d'essai pétrole/eau elle-même, à la méthode utilisée pour préparer la solution ou à l'une ou l'autre. Par exemple, lorsqu'un document donné désigne un mélange pétrole-eau comme une fraction adaptée à l'eau, on peut supposer que la terminologie se rapporte au produit d'un mélange à faible énergie sur une plaque d'agitation magnétique, selon la définition du CROSERF (Aurand et Coelho 2005). Cependant, « WAF » se rapporte parfois à la solution créée par l'eau de dilution qui s'écoule sur un substrat mazouté (p. ex., Adams *et al.* 2014a).

Des problèmes semblables existaient avec « WSF », qui désigne souvent les solutions pétrole/eau dont la composition est visiblement similaire, mais qui sont préparées à l'aide de méthodes très différentes. Par exemple, Akaishi *et al.* (2004) ont employé WSF pour désigner les solutions préparées en ajoutant du pétrole à de l'eau remuée lentement et en les

mélangeant sur une plaque d'agitation magnétique, selon Anderson *et al.* (1974). Sinon, WSF était produite par de l'eau de dilution s'écoulant dans la colonne de chlorure de polyvinyle remplie de billes de céramique immergées au préalable dans du pétrole (Kennedy et Farrell 2005). À l'inverse, certaines publications utilisaient différents termes pour décrire la même méthode de préparation ou solution d'essai. Par exemple, Santos *et al.* (2013) et Mattos *et al.* (2010) produisaient une WSF et une WAF, respectivement, même si tous deux suivaient le protocole de mélange décrit par Singer *et al.* (2000). Sans la caractérisation chimique, il est difficile de déterminer si les solutions de deux études différentes sont réellement équivalentes. La WSF s'est distinguée de la WAF par la filtration visant à supprimer le pétrole particulaire, mais la vérification de l'absence de gouttelettes à l'aide d'une filtration ou d'une analyse chimique (Anderson *et al.* 1974; Carlsson *et al.* 2014) était rare. La présence de pétrole particulaire fausse les analyses chimiques des solutions d'essai et l'interprétation de la toxicité. C'est pourquoi le CROSERF a adopté la terminologie de la WAF, car elle n'implique pas l'absence de pétrole particulaire ou de micelles composées de pétrole (Faksness *et al.* 2008). Dans le présent rapport, la WSF est équivalente à la WAF et, le cas échéant, il existe une description de la présence de pétrole particulaire.

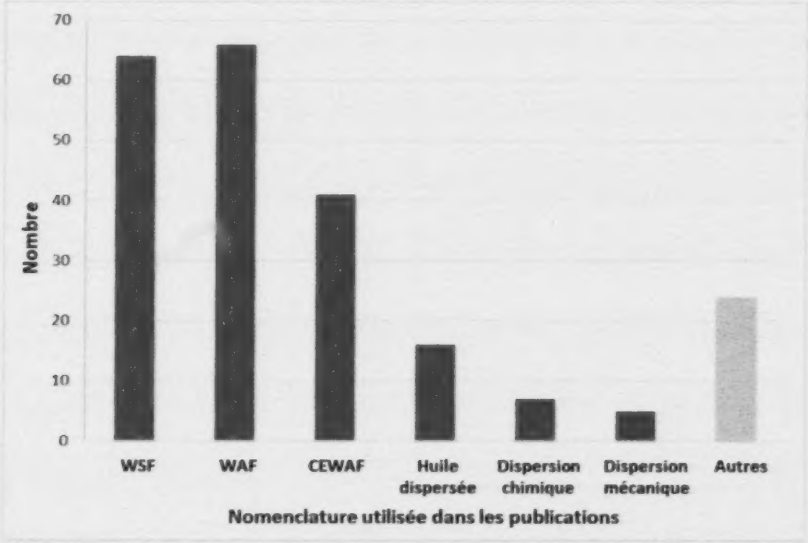

Figure 1 : Nombre de termes décrivant les solutions pétrole/eau ou les méthodes pour préparer ces solutions, pour les essais de toxicité (N = 223) (du tableau 2). ***Autres*** *se rapporte aux termes utilisés trois fois ou moins (énumérés dans le tableau 3).*

Tableau 3 : Liste de termes apparaissant trois fois ou moins dans l'analyse documentaire et classés comme ***Autres*** *(Figure 1). En raison de la similarité des descripteurs, le pétrole brut incluait « pétrole brut (PB) ».*

Nombre d'utilisations du terme = 1	
• Effluent provenant de colonnes de gravier recouvert de pétrole échoué • Effluent provenant d'une colonne de gravier recouvert de pétrole • Effluent provenant de colonnes de roches mazoutées • Pétrole émulsionné	• Gravier et effluent recouverts de pétrole • Pétrole dans un milieu d'agents dispersants • Milieu contenant uniquement du pétrole • Dispersion pétrole-eau • Fraction adaptée à l'eau dispersée physiquement (WAF dispersée

Nombre d'utilisations du terme = 1	
• Émulsions de pétrole et d'agent dispersant • Pétrole flottant • Eau de mer contenue dans le pétrole	physiquement) • Percolation de l'eau par du gravier recouvert de pétrole
Nombre d'utilisations du terme = 2	
• Gravier contaminé par le pétrole	
Nombre d'utilisations du terme = 3	
• Pétrole brut	• Effluent de gravier mazouté • Eau de traitement provenant du gravier mazouté

Certains praticiens ont aussi modifié des termes couramment utilisés, comme WAF, pour transmettre des renseignements supplémentaires sur la dispersion du pétrole, le type de pétrole, la méthode de mélange, l'énergie de mélange, etc. Par exemple, « **WSFd** » désignait la fraction hydrosoluble du bitume dilué (Alderman *et al.* 2016). Sinon, « **WSFD** » ou « **WSD** » décrivaient la fraction hydrosoluble du carburant diesel (Simonato *et al.* 2008), mais Hedayati et Jahanbakhshi (2012) utilisaient « **WSD** » pour décrire les doses hydrosolubles des hydrocarbures. Clairement, le manque d'uniformité dans l'utilisation des termes rend difficile la supposition de détails importants concernant la méthode et la nature des solutions d'essai, au même titre qu'un nombre insuffisant de renseignements (p. ex., l'utilisation du terme « **pétrole dispersé** » sans descripteur supplémentaire).

Environ 11 % des méthodes étaient classées comme **Autres** (termes qui ne pouvaient pas être regroupés dans les catégories du tableau 1 et qui étaient utilisés par trois publications ou moins), ce qui reflétait le manque d'uniformité dans l'appellation des solutions d'essais ou des méthodes de préparation.

Bien que de nombreux termes soient équivalents, cette similarité ne peut pas toujours être supposée à partir de la nomenclature seule. Il est indispensable que la terminologie normalisée transmette clairement des renseignements précis sur la solution d'essai ou la méthode de préparation. La terminologie normalisée devrait tenir compte de la définition publiée ou d'origine du terme, assurer la communication claire du terme, en tant que descripteur de la solution d'essai ou de la méthode de préparation (ou les deux), et utiliser de nouveaux acronymes uniquement lorsqu'ils ne sont pas disponibles à partir d'autres applications. Le cadre proposé pour cette analyse (chapitre 5) utilise les termes WAF et CEWAF définis par le CROSERF et modifiés au besoin pour indiquer l'énergie appliquée au mélange. Il convient aussi de reconnaître que les termes comme « énergie de mélange » sont relatifs (p. ex., faible par rapport à grande) ou définis dans la pratique (c.-à-d. vitesses du barreau d'agitation pour produire un tourbillon précis). Aucune technologie n'était signalée pour quantifier l'énergie de mélange dans des contenants de laboratoire ou dans des sites de déversements de pétrole (voir la section 3.2.2).

Pour réduire la confusion, chaque méthode publiée dans le présent rapport a été classée selon l'énergie de mélange, l'ajout d'un agent dispersant chimique et la différenciation entre l'ajout de pétrole dans l'eau ou un substrat (Tableau 4). Les catégories de méthodes pour préparer les solutions d'essai dans le tableau 4 ont permis non seulement d'améliorer l'uniformité, mais aussi de déterminer les méthodes le plus souvent utilisées. La plupart des 223 méthodes examinées ont été caractérisées comme étant une **dispersion physique/mécanique** dans le tableau 4. En revanche, la figure 1 démontre que le terme le plus couramment utilisé était WSF,

qui implique un mélange sans tourbillon. Les études portant sur la WSF devraient être classées sous **Absence de dispersion**. Cependant, le groupe **dispersion physique/mécanique** du tableau 4 comprend 27 méthodes désignées comme étant la WSF par les auteurs alors qu'en réalité, un mélange mécanique suffisant était utilisé pour produire une dispersion. De même, 12 méthodes décrites comme produisant une WAF ont été classées sous **Absence de dispersion** étant donné qu'elles suivaient le protocole du CROSERF concernant la WAF précisant un mélange à faible énergie pour éviter la formation de tourbillon (Aurand et Coelho 2005).

La deuxième caractérisation la plus courante était la **dispersion chimique** de solutions d'essai préparées avec un agent dispersant chimique et un mélange mécanique, même s'il n'était pas toujours clair que le protocole suivait les lignes directrices du CROSERF. Représentant un nombre plus faible, les méthodes ont été caractérisées comme étant celles liées au **substrat mazouté** qui incluaient un éventail varié de termes, y compris WAF, effluent de gravier mazouté, effluent provenant de colonnes de gravier recouvert de pétrole échoué, etc. Les méthodes de substrat mazouté simulent les répercussions du pétrole sur les embryons dans les hauts-fonds de fraie. Elles pourraient être décrites comme des essais de toxicité aquatique, car les poissons sont exposés à l'eau qui était en contact avec le pétrole (WAF) ou comme des essais de toxicité des sédiments, car la toxicité peut être liée à la concentration de pétrole dans les sédiments. Une faible proportion de méthodes n'était pas suffisamment détaillée pour qu'il soit possible de les associer à une catégorie dans le tableau 4.

Tableau 4 : Liste des méthodes utilisées pour préparer les solutions pétrole/eau pour les essais de toxicité. Ces caractérisations sont des descriptions générales et pourraient correspondre ou non à la nomenclature utilisée pour décrire la méthode de préparation dans chaque publication (Figure 1).

Description générale de la méthode utilisée	Détails clés de la méthode	Nombre	% des méthodes totales
Sans dispersion	Pétrole flottant, sans tourbillon	30	13,5
Dispersion physique/mécanique	Tourbillon ou fractionnement du pétrole sous forme de gouttelettes, aucune différenciation entre le pétrole dissous et le pétrole particulaire	83	37,2
Dispersion chimique	Ajout d'un agent dispersant chimique, inclut la dispersion physique/mécanique	66	29,6
Substrat mazouté	Ajout de pétrole à un substrat suivi d'une désorption	19	8,5
Renseignements insuffisants	La publication ne fournissait pas suffisamment de détails pour qu'il soit possible de classer la méthode dans les descriptions générales	25	11,2
Total :	-	223	S.O.

3.4 LE PROCESSUS DU CROSERF

L'état de la Californie, puis la Marine Spill Response Corporation (MSRC) ont appliqué le processus du CROSERF en raison des limites des essais de toxicité des hydrocarbures qui avaient été présentés (section 3.0), en vue d'améliorer la comparabilité des résultats des essais et de pouvoir mieux prédire la toxicité des agents dispersants et des hydrocarbures dispersés chimiquement. Cette vaste collaboration, qui a regroupé les milieux universitaire, gouvernemental et industriel, a été mise en place en 1994 afin d'élaborer des méthodes

normalisées sur la toxicité des hydrocarbures. Dans leur rapport technique, résumé ci-après, Aurand et Coelho (2005) ont décrit les objectifs et les constatations de l'initiative du CROSERF.

Les objectifs précis étaient de résoudre des questions scientifiques liées à l'utilisation des agents dispersants, d'encourager la normalisation, de stimuler la coopération, d'intégrer des données de laboratoire appropriées dans le processus décisionnel relatif aux agents dispersants et de favoriser l'élaboration de protocoles d'évaluation des risques. Les difficultés rencontrées pour interpréter les données sur les agents dispersants et la toxicité des hydrocarbures dispersés venaient des méthodes utilisées pour les études réalisées en laboratoire et de la relation entre ces études et les expositions pertinentes sur le plan environnemental. Comme Aurand et Coelho (2005) l'ont souligné, l'analyse et la comparaison des résultats ont été entravées par l'insuffisance de la caractérisation des concentrations d'hydrocarbures dans les solutions d'essai et des rapports correspondants, les effets inconnus de la température sur la toxicité et le manque d'information sur les effets à des concentrations pertinentes sur le plan environnemental. Une préoccupation majeure résidait dans le fait que beaucoup d'études testaient des concentrations d'hydrocarbures excessivement élevées et des durées d'exposition plus longues que celles qui pourraient se produire pendant un déversement, compte tenu d'un scénario de déversement de pétrole en haute mer.

Le CROSERF a produit un ensemble de méthodes qui, une fois normalisées, ont permis de réduire la variabilité des essais de toxicité des hydrocarbures d'un laboratoire à l'autre. Singer *et al.* (2001a) avaient déterminé que les éléments des essais de toxicité qu'il fallait normaliser en priorité étaient les méthodes utilisées pour préparer les solutions, les régimes d'exposition et la mesure analytique des solutions.

Ces priorités sont toujours valables, même si les scénarios envisagés dans les essais de toxicité ont été considérablement étendus pour inclure les déversements dans les écosystèmes d'eau douce (lentiques et lotiques), de l'Arctique et de la région subarctique. Les déversements, comme l'éruption du puits de Deepwater Horizon, ont fourni des fonds importants à la recherche nécessaire aux évaluations des risques et des dangers (Redman et Parkerton 2015). Malheureusement, ces nouvelles recherches n'ont pas toujours suivi les méthodologies recommandées pour les essais de toxicité des hydrocarbures et ont produit des données qu'il n'est pas facile de comparer à celles tirées d'autres études. Avec 15 ans d'expérience, les lacunes des protocoles du CROSERF ont également été cernées et le présent examen, comme d'autres, a permis de déterminer qu'il est nécessaire d'améliorer la qualité de la conception des expériences pour évaluer les hydrocarbures comme un mélange complexe.

3.4.1 Documents d'orientation pour améliorer les études de la toxicité des hydrocarbures

La qualité des données tirées des essais de toxicité peut poser différents problèmes : précision; exactitude; certitude statistique; interprétation des résultats; comparabilité des études entre les différents hydrocarbures; conditions des essais; espèces et paramètres; adéquation des conditions des essais; extrapolation des données provenant d'études en laboratoire pour les conditions et expositions propres à un site. La réglementation exige que les essais de toxicité produisent des relations exposition-réaction définies et reproductibles, avec une caractérisation adéquate de l'exposition pour évaluer le risque posé par les contaminants avec des concentrations dans l'environnement prévues ou mesurées (Harris *et al.* 2014) (Encadré 2). Il est plus facile de déterminer la causalité avec des produits chimiques pris individuellement ou des mélanges simples, mais l'exercice se complique avec la complexité des solutions utilisées pour les essais. Il est difficile d'interpréter les essais de toxicité des hydrocarbures, car la plupart de leurs composantes sont inconnues et très peu solubles dans l'eau (Landrum *et al.* 2013). Les comparaisons sont encore compliquées par les solutions des essais multiphasiques

dans lesquelles les phases particulaire et dissoute peuvent contribuer à la toxicité du mélange (p. ex., Sørhus *et al.* 2015).

Redman et Parkerton (2015) ont défini les caractéristiques des essais de toxicité qui compliquent les comparaisons entre les hydrocarbures et les interprétations. Ils ont mis en évidence la façon dont la conception de l'étude a une incidence sur l'exposition au pétrole et sur l'interprétation de la toxicité, et ont présenté un ensemble de principes directeurs pour améliorer les essais réalisés sur les produits pétroliers (Encadré 3). Le principe 1 a montré que la toxicité mesurée d'une solution d'hydrocarbures dépend de la concentration de produits chimiques et de la composition de la solution, quelle que soit la méthode utilisée pour générer la solution d'essai. Il faut donc prendre en compte les caractéristiques du produit pétrolier dans la conception de l'expérience. Les principes 2, 3 et 4 ont indiqué que la concentration et la composition de la phase dissoute dans les solutions d'essai dépendent des méthodes utilisées pour préparer les solutions d'essai, de la proportion des particules d'hydrocarbures dans la préparation, de la hauteur du récipient de mélange (en particulier pour les composants volatils) et de la composition de la substance d'essai. Selon le principe 5, les différences entre les régimes d'exposition (p. ex., expositions constantes par rapport à des expositions décroissantes variables dans le temps) modifient la composition des solutions d'essai et la toxicité qui en découle. Selon les modèles toxicocinétiques, les expositions constantes donnent plus de temps à toutes les composantes d'atteindre l'équilibre entre les gouttelettes et l'eau et entre l'eau et les tissus. Dans les expositions à des concentrations décroissantes d'hydrocarbures, les hydrocarbures les plus solubles sont dominants au début de l'exposition, mais perdent de leur importance au fil du temps. Les HAP plus persistants sont moins présents que dans les régimes d'exposition constante, mais diminuent dans une moindre mesure que les composants volatils au fil du temps. Il est important de noter que la létalité aiguë du pétrole est attribuée à la perte rapide de benzène, de toluène, d'éthylbenzène et de xylène (BTEX) et d'autres composés volatils dans les solutions d'essai, et que la toxicité chronique est liée aux HAP plus persistants. Le principe 6 indique que la phase dissoute peut être caractérisée à l'aide d'échantillonneurs passifs. À partir de ces principes, les auteurs ont préparé une série de questions (Encadré 3) pour évaluer la qualité de huit études de toxicité publiées récemment et ont conclu que deux seulement apportaient des réponses au moins partielles à l'ensemble des critères. Bien que Redman et Parkerton (2015) se soient concentrés sur la létalité aiguë, leurs principes s'appliquent également aux essais de toxicité chronique et fournissent une justification solide des méthodes d'analyse habituelles qui génèrent des concentrations constantes d'hydrocarbures dans l'eau.

Encadré 2.
Principes d'une écotoxicologie saine
(Harris *et al.* 2014)

- Une planification adéquate et une bonne conception de l'étude sont essentielles.
- Définir la situation de départ.
- Inclure les contrôles appropriés.
- Utiliser des voies d'exposition et des concentrations convenables.
- Définir l'exposition.
- Comprendre vos outils.
- Tenir compte de l'analyse statistique des résultats au moment de concevoir une expérience.
- Tenir compte de la dose-réponse.
- Répéter l'expérience.
- Tenir compte des facteurs de confusion.
- Tenir compte du poids de la preuve.
- Présenter les constatations de manière objective.

Encadré 3 :
Principes relatifs aux essais de toxicité des hydrocarbures
(Redman et Parkerton 2015)

Principes :

- En général, ce sont la concentration et la composition des hydrocarbures dissous qui déterminent la toxicité aquatique des hydrocarbures dispersés physiquement et chimiquement.
- Les expositions aux hydrocarbures dissous dépendent de la méthode de préparation de la fraction adaptée à l'eau (WAF);
- Les expositions aux hydrocarbures dissous dépendent de la hauteur du système d'essai de la WAF;
- Les expositions aux hydrocarbures dissous dépendent de la composition des substances;
- Les hydrocarbures solubles contribuent davantage à la toxicité dans les expositions variables dans le temps;
- Les échantillonneurs passifs permettent de mesurer directement les expositions aux hydrocarbures dissous.

Questions d'évaluation

- Est-ce que l'étude donne la composition des hydrocarbures dans le milieu d'exposition plutôt que les concentrations d'hydrocarbures totaux, mesurées ou nominales?
- Est-ce que l'étude exprime différents traitements sur le plan des unités toxiques en phase dissoute pour faciliter la comparaison des résultats de la toxicité observée entre les hydrocarbures / méthodes de dispersion?
- Est-ce que la méthode de dosage (p. ex., WAF, gravier mazouté) et les enceintes d'exposition sont ouvertes ou fermées? Si elles sont fermées, le volume de l'espace de tête est-il précisé?
- La composition de la substance est-elle indiquée pour permettre de comparer les prédictions du modèle de devenir aux mesures de l'exposition observée pour les composantes de la substance?
- Les composantes BTEX sont-elles prises en compte?
- A-t-on utilisé les mesures de l'échantillonnage passif pour pouvoir mesurer les expositions aux hydrocarbures dissous?

Plusieurs publications récentes ont également critiqué des documents précis qui, selon les auteurs, n'ont pas été préparés, conçus, réalisés ou interprétés correctement. Par exemple, Coelho *et al.* (2013) et Redman et Parkerton (2015) ont examiné Rico-Martínez *et al.* (2013) et cerné les faiblesses dans leurs méthodes d'analyse, notamment l'absence de méthodologie normalisée (ils n'ont pas indiqué la charge en hydrocarbures ou les conditions de mélange du pétrole) et le fait qu'ils n'ont pas mesuré les hydrocarbures pétroliers (HCP) totaux et les HAP totaux afin de caractériser les expositions pour comparer la toxicité à d'autres études.

3.4.2 Protocole du CROSERF pour les essais de toxicité du pétrole (Aurand et Coelho 2005)

Les méthodes les plus couramment utilisées pour mélanger le pétrole et l'eau aux fins des essais de toxicité sont les protocoles du CROSERF (Tableaux 5 et 6). Elles ont été élaborées pour les essais de toxicité marine, c.-à-d. les essais pratiqués sur des espèces marines en eau salée naturelle ou artificielle. Les méthodes d'exposition utilisées dépendent des objectifs de l'étude et souvent de la nature prévue des expositions environnementales, p. ex., si le pétrole flotte à la surface de l'eau, est dispersé dans la colonne d'eau ou interagit avec les sédiments; elles dépendent aussi du fait que les concentrations sont constantes ou varient au fil du temps. Néanmoins, le but du régime d'exposition est de générer une série de concentrations

d'exposition qui causent différentes réponses, de manière à pouvoir calculer les concentrations létales médianes (CL50), les concentrations effectives médianes (CE50; réponses sublétales) ou les concentrations seuils.

Le tableau 5 présente la terminologie pour les trois principales méthodes de préparation des solutions et les six régimes pour l'exposition des organismes aquatiques aux solutions d'essai préparées. Les régimes d'exposition varient sur le plan de la stabilité des concentrations d'hydrocarbures au fil du temps. Dans les expositions constantes, l'objectif est de maintenir les concentrations constantes au fil du temps, à l'aide de protocoles sans renouvellement statique (SRS; les solutions d'essai ne sont pas remplacées pendant l'exposition), avec renouvellement statique (RS; remplacement des solutions d'essai dans un intervalle de temps prédéterminé) ou à flux continu (FC). En revanche, les protocoles avec exposition additionnée (EA) réduisent les concentrations d'hydrocarbures au fil du temps en diluant constamment les solutions d'essai avec de l'eau douce et dans les expositions intermittentes, les organismes d'essai sont exposés en alternance aux concentrations fixes des solutions d'essai et à de l'eau limpide, à des intervalles fixes. Les différentes méthodes, ainsi que les caractéristiques chimiques et physiques des hydrocarbures utilisés pour l'essai, y compris les bitumes dilués, auront une incidence sur la concentration et la composition des solutions d'essai (phase du pétrole, distribution par taille des gouttelettes).

Tableau 5: Terminologie du protocole du CROSERF (tiré d'Aurand et Coelho 2005).

Préparation de la solution

TERMINOLOGIE DU PROTOCOLE	DESCRIPTION DE LA MÉTHODE DANS AURAND ET COELHO 2005	NOTES SUR LA TERMINOLOGIE UTILISÉE DANS CE RAPPORT
Fraction adaptée à l'eau (WAF)	« [...] solution découlant du mélange à faible énergie (pas de tourbillon lors du brassage par barreau aimanté) des matières d'essai qui doivent être exemptes de particules de matières en vrac (> 1 micron de diamètre) »	Correspond à WSF et LEWAF dans le tableau 2.
WAF physiquement améliorée (PE-WAF)	« [...] mélange à énergie grande à très grande (tourbillon ≥ 25 %) des matières d'essai et d'eau uniquement (pas de dispersant chimique) dans lequel une population relativement stable de gouttelettes de matières en vrac (1-70 microns de diamètre) est présente »	Correspond à MEWAF dans le tableau 2. Certaines études utilisent WSF et WAF pour la même procédure.
WAF chimiquement améliorée (CE-WAF)	« [...] mélange à tourbillon de 20-25 % des matières d'essai et d'un dispersant chimique dans lequel une population relativement stable de gouttelettes de matières en vrac (1-70 microns de diamètre) est présente »	Correspond à CEWAF dans le tableau 2 (terme utilisé tout au long du présent rapport). Aussi appelé HECEWAF.

Régime d'exposition

TERMINOLOGIE DU PROTOCOLE	DESCRIPTION DE LA MÉTHODE DANS AURAND ET COELHO 2005	NOTES SUR LA TERMINOLOGIE UTILISÉE DANS CE RAPPORT
Exposition constante (EC)	« renvoie à une exposition constante dans laquelle l'objectif est une concentration constante. Dans ce type d'exposition, les organismes sont placés dans	Le texte du CROSERF implique que les protocoles sans renouvellement

TERMINOLOGIE DU PROTOCOLE	DESCRIPTION DE LA MÉTHODE DANS AURAND ET COELHO 2005	NOTES SUR LA TERMINOLOGIE UTILISÉE DANS CE RAPPORT
	une enceinte et exposés à une solution d'essai pendant une période donnée. L'exposition peut être à flux continu, sans renouvellement statique ou avec renouvellement statique (voir les définitions). Les essais durent habituellement 48 ou 96 heures ».	statique et avec renouvellement statique doivent générer des expositions constantes, mais ce n'est pas le cas (chapitre 4.3).
Flux continu (FC)	« renvoie à une exposition constante au cours de laquelle les organismes sont placés dans une solution d'essai non diluée dans une enceinte d'essai à flux continu. Les pompes sont activées et y envoient une solution d'essai à concentration constante (pas de dilution de la solution d'essai). Pendant ce type d'exposition, il faut veiller à ce que les composantes de la solution d'essai ne s'échappent pas à travers les parois du tube. »	
Exposition intermittente (EI)	« renvoie à une exposition périodique à la concentration. Dans ce type d'exposition, les organismes sont placés dans une enceinte statique ferme sans espace de tête au-dessus de la solution d'essai. Ils sont maintenus dans la solution pendant une période donnée, puis retirés et placés dans de l'eau limpide. Ce type d'essai ne doit pas être réalisé dans un type d'enceinte précis, ni pendant une durée d'exposition définie à la solution d'essai avant le transfert dans l'eau limpide. Les essais durent habituellement 48 ou 96 heures ».	
Exposition additionnée (EA)	« renvoie à une exposition à une concentration décroissante. Dans ce type d'exposition, les organismes sont placés dans une solution d'essai non diluée dans les enceintes d'essai à flux continu. Les pompes sont activées et on dilue lentement le contenu des enceintes avec de l'eau limpide. Le débit normalement utilisé pour la dilution dans les enceintes (conçu par UCSC) est de 2 ml/min, qui correspond à une demi-vie équivalente (de la solution d'essai) de 1,67 heure. Les essais durent habituellement 48 ou 96 heures ».	Il est à noter que la concentration d'essai décroissante à 2 ml/min est fondée sur une enceinte d'essai de toxicité à flux continu de 240 ml définie par le CROSERF.
Sans renouvellement statique (SRS)	« renvoie à une exposition constante au cours de laquelle les organismes sont placés dans une enceinte statique fermée, sans espace de tête au-dessus de la solution d'essai. La solution d'essai initiale est utilisée pendant toute la durée de l'exposition (elle n'est pas renouvelée). »	Les régimes d'exposition SRS sont caractérisés par la diminution de la concentration de la solution d'essai dans le temps (Aurand et Coelho 2005).
Avec renouvellement statique (RS)	« renvoie à une exposition constante au cours de laquelle les organismes sont placés dans une enceinte statique fermée, sans espace de tête au-dessus de la solution d'essai. La solution d'essai est renouvelée à intervalles réguliers (habituellement 24 heures) par une solution d'essai fraîche à la	Les régimes d'exposition RS sont également caractérisés par la diminution quotidienne de la concentration de la solution d'essai pendant la durée de

TERMINOLOGIE DU PROTOCOLE	DESCRIPTION DE LA MÉTHODE DANS AURAND ET COELHO 2005	NOTES SUR LA TERMINOLOGIE UTILISÉE DANS CE RAPPORT
	même concentration. »	l'exposition (série de pics) (Aurand et Coelho 2005).

L'annexe 1 présente les éléments des protocoles du CROSERF pour préparer et utiliser les solutions d'essai WAF et CEWAF, y compris la préparation de la substance d'essai et des solutions d'essai, les essais de toxicité et les résultats, la caractérisation chimique des substances d'essai et des solutions d'essai, et les analyses statistiques. Certains détails sont décrits ci-après.

3.4.2.1 Méthodes de préparation des solutions d'essai (détails résumés à l'annexe 1)

Les hydrocarbures mis à l'essai doivent être conservés dans l'obscurité, à < 5 — C, dans des contenants en métal ou en verre fermés hermétiquement où l'espace de tête est minime; éviter le gel en raison de la séparation des cires et des asphaltènes. La préparation des hydrocarbures varie selon l'état d'altération de l'huile mise à l'essai. Aucune préparation n'est nécessaire pour les tests réalisés sur le pétrole brut frais. Les essais climatiques doivent durer de 6 à 24 heures, selon la méthode ASTM D2892 (distillation fractionnée jusqu'à un seuil de 400 °C) ou D86 et être équivalents à l'altération se produisant durant un déversement réel. L'altération naturelle n'est pas recommandée, car elle n'est pas reproductible. Les directives proposées dans cet examen (Tableau 7) recommandent que les températures maximales ne dépassent pas 200 °C (D2892) ou 130 °C (D86). L'huile altérée doit être caractérisée chimiquement selon la même méthode d'analyse que son huile mère, de préférence par un laboratoire commercial.

Les protocoles du CROSERF ont été élaborés uniquement pour les écosystèmes marins et n'offrent pas de directives pour préparer les solutions avec de l'eau douce. La préparation de l'eau de mer de dilution doit être la même pour les solutions WAF et CEWAF : filtration minimale de 0,45 micron; bonne aération; eau de mer locale ou reconstituée (sel de mer dilué dans de l'eau désionisée); la salinité doit répondre aux exigences de l'organisme mis à l'essai. L'eau de dilution et l'huile doivent être mélangées dans un récipient fermé (généralement une tourie cylindrique) d'une taille appropriée pour produire le volume de solution requis pour chaque concentration de l'essai. Les tailles minimale et maximale suggérées sont de 1 et 20 litres, respectivement, avec un espace de tête de 20-25 %. Pour les solutions WAF et CEWAF, il faut ajouter un volume connu d'huile à l'eau de dilution dans un récipient de mélange (charge de 0,01 à 25 g/l) après le début du mélange; la masse produite doit être calculée par la différence de poids. Uniquement pour les solutions CEWAF, il faut ajouter de manière séquentielle un volume connu de dispersant (Corexit 9500 ou Corexit 9527 par exemple) à l'eau de dilution après l'huile, selon un ratio dispersant/huile de 1:10. Les solutions doivent être mélangées à l'aide d'une plaque d'agitation magnétique avec un barreau dont la taille variera en fonction du volume du récipient de mélange; il n'est pas obligatoire d'indiquer la taille du barreau. Le CROSERF avait à l'origine spécifié une faible énergie de mélange pour les solutions WAF afin d'éviter la formation d'un tourbillon (180 à 240 tr/min) et une énergie de mélange plus grande pour les solutions CEWAF afin de produire un tourbillon égal à 20-25 % de la profondeur de l'eau, mais le Comité a par la suite recommandé des énergies de mélange égales pour les deux types de solutions, de manière à mieux représenter les conditions environnementales pendant un déversement. Un tourbillon de 20-25 % a été retenu comme représentatif des conditions sur le terrain, car il ne produit pas de dispersion physique ni d'émulsification dans les touries d'une contenance comprise entre 1 et 20 litres. Le mélange doit être effectué dans l'obscurité ou dans les conditions de luminosité d'un laboratoire, dans un environnement à température contrôlée,

selon la température appropriée pour l'organisme mis à l'essai. Le temps de mélange doit être fonction du type d'hydrocarbures et de la charge, mais on recommande de 18 à 24 heures, en partie afin de se coordonner avec les expositions quotidiennes avec renouvellement statique, suivies d'une période de 3 à 6 heures de sédimentation, uniquement pour les solutions CEWAF. Les solutions doivent être mises à l'essai dans les 24 heures afin de prévenir la perte des volatils et l'instabilité de la composition et de la concentration de la solution. Les échantillons prélevés aux fins d'analyse chimique doivent être acidifiés immédiatement et analysés dans un délai de 7 jours pour les volatils (BTEX) et de 14 jours pour les composés semi-volatils.

3.4.2.2 Régime d'exposition et résultat de l'essai (détails résumés à l'annexe 1)

Après avoir préparé la solution, il faut ajouter les animaux soumis à l'essai (espèces vivant dans des eaux tempérées, en suivant les directives sur la manipulation et les soins de l'ASTM, de l'OCDE et de l'EPA ou des directives équivalentes) dans les enceintes étanches : les solutions sont placées dans l'enceinte ouverte, les animaux y sont transférés en ajoutant le moins possible d'eau limpide et l'enceinte est scellée. Pour les protocoles FC et EA, les solutions d'essai ou l'eau limpide sont ajoutées par une ouverture sur le dessus.

Le CROSERF a décrit des protocoles pour deux méthodes d'exposition pour les essais de toxicité aiguë de 96 h : les essais à exposition additionnée et les essais à exposition constante. Pour les expositions additionnées, on ajoute la solution d'essai non diluée avant de placer les animaux, puis on verse de l'eau limpide dans les enceintes à un débit de 2 ml/min une fois les organismes mis à l'essai placés dans une enceinte d'essai de toxicité à flux constant de 240 ml du CROSERF. La demi-vie prévue de la concentration initiale est d'environ 2,5 heures, avec une diminution de 95 % dans les 12,5 heures (mais la diminution devrait être surveillée par des analyses chimiques dans les 6 à 8 premières heures de l'exposition). Les expositions additionnées ont été conçues pour refléter la rapidité de la propagation et de la dilution d'un déversement en haute mer. De nombreux autres aspects sont nécessaires pour modéliser les eaux côtières ou restreintes, notamment le volume des hydrocarbures, le potentiel diluant des eaux réceptrices (c.-à-d. pour simuler des dilutions plus lentes dont la demi-vie est de 5 à 10 heures), le régime énergétique au moment du déversement et les conditions hydrographiques.

Pour les essais à exposition constante, on verse la solution dans des contenants à couvercle en verre (en laissant un espace de tête de 20 %) avant d'ajouter les organismes mis à l'essai. Toutes les 24 heures, on remplace 90 % de la solution d'essai par une solution fraîche. Il convient de surveiller la mortalité et les autres effets tous les jours, bien qu'il soit précisé de ne pas retirer les animaux morts. Les indicateurs doivent comprendre la létalité (CL50 après 96 h) et les premiers effets narcotiques (moribondité) (CE50 à 0,5-1 h). L'accent est mis sur la létalité aiguë et aucune méthode d'essai avec exposition chronique n'est recommandée.

Il convient d'indiquer les méthodes statistiques chaque fois que l'on présente des estimations des indicateurs ou d'autres données toxicologiques. Le CROSERF recommande des essais précis pour l'analyse statistique. Si la distribution des données est normale, il faut procéder à un essai selon la méthode des probits pour estimer les indicateurs toxicologiques. Pour les distributions non paramétriques (p. ex., s'il n'y a pas de mortalité témoin), il faut réaliser un essai Spearman-Kärber ou Spearman-Kärber avec équeutage pour estimer les paramètres toxicologiques. La comparaison des intervalles de confiance de 95 % devrait permettre de déterminer des différences importantes. Si un essai ne produit pas de mortalité partielle (c.-à-d. uniquement une mortalité de 0 ou de 100 %), on recommande d'utiliser la méthode binomiale ou de recommencer l'expérience avec une fourchette différente de concentrations.

3.4.2.3 Organismes mis à l'essai

Le CROSERF a recommandé plusieurs espèces de poissons pour les essais de toxicité, notamment les larves de capucette barrée (*Atherinops affinis*), *Menidia beryllina* et les larves de tambour rouge (*Scianops ocellatus*). Les comparaisons de la toxicité des hydrocarbures entre les espèces recommandées et les espèces régionales mises à l'essai ont montré des résultats semblables (Aurand & Coelho 2005). Les soins et la manipulation des animaux doivent suivre les protocoles publiés de l'ASTM, de l'OCDE et de l'Environmental Protection Agency des États-Unis.

3.4.2.4 Méthodes de caractérisation des hydrocarbures et des solutions d'essai (détails résumés à l'annexe 1)

Le CROSERF recommande, pour les solutions WAF et CEWAF, de procéder à une caractérisation complète de l'hydrocarbure initial par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). Avant les essais de toxicité, il faut analyser les hydrocarbures pétroliers totaux (hydrocarbures pétroliers totaux, $C_{10} - C_{36}$) et les composés volatils ($C_6 - C_9$) par GC couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID) dans les solutions WAF et CEWAF; l'analyse des HAP est facultative. Il convient de répéter la même caractérisation chimique à la fin de l'expérience pour les essais statiques. Pour les essais avec renouvellement, il faut prélever les échantillons au moins une fois avant chaque renouvellement. Pour les essais additionnés, les échantillons doivent également être prélevés une ou plusieurs fois pendant l'exposition. Les témoins de dispersant sont une série de concentrations contenant uniquement l'agent dispersant (de 1 à 1 000 mg/l) dans la même eau de mer que celle utilisée pour les essais de toxicité. La série de dilutions peut servir à créer une courbe d'étalonnage aux fins d'analyse par spectrophotomètre opérant en ultraviolet et dans le visible (UV-VIS) dans les deux heures suivant la collecte de l'échantillon. Il convient d'utiliser les maxima d'absorption déterminés pour le dispersant pour toutes les analyses de dispersant des solutions CEWAF.

Des critères de rendement de la caractérisation chimique sont nécessaires pour garantir la validité des comparaisons des hydrocarbures entre les laboratoires. Les hydrocarbures pétroliers totaux (équivalant au carbone organique extractible total, C_{10} à C_{36}) doivent être mesurés par GC-FID selon la technique d'intégration de référence courante; les hydrocarbures totaux résolus (« $TPH_{resolved}$ ») doivent être indiqués pour les différents composés et non selon cette méthode. Une analyse des hydrocarbures pétroliers totaux doit comprendre au moins un étalon substitut (o-terphényle avec récupération de 70 à 120 %) et un étalon interne (peut être propre au laboratoire pour autant qu'il ne coélue pas avec l'hydrocarbure mis à l'essai), et il ne faut pas corriger les résultats en fonction de la récupération. Il est possible d'utiliser une autre méthode que la GC-FID, à condition que le rapport d'analyse la compare à la GC-FID.

Il faut mesurer les hydrocarbures volatils par GC-FID ou GC-MS, selon l'équipement disponible et à condition que l'instrument puisse déterminer les analytes cibles minimaux (annexe 2, tableau 2A). Les expérimentateurs peuvent décider de sortir de cette liste, mais ils doivent l'indiquer aux fins des comparaisons des études entre laboratoires. Il faut utiliser un étalon interne (peut être propre au laboratoire pour autant qu'il ne coélue pas avec l'hydrocarbure mis à l'essai). L'étalon substitut recommandé pour l'analyse GC-MS des composés volatils est le toluène-d.

L'analyse des différents composés semi-volatils est facultative en raison de son coût et des contraintes de temps, mais une liste d'analytes a été proposée (annexe 1) à partir de la liste des composés semi-volatils courants analysés durant les évaluations des dommages à la suite d'un déversement de pétrole. Les analyses des composés semi-volatils peuvent être plus pertinentes dans les essais de toxicité chronique (essais ne relevant pas du CROSERF)

puisque ces composés, et plus précisément les HAP ayant de 3 à 5 anneaux et des chaînes latérales alkyles, sont reconnus comme étant les composants du pétrole présentant la plus grande toxicité chronique pour les premiers stades biologiques des poissons (Hodson *et al.* 2007; Adams *et al.* 2014a; Bornstein *et al.* 2014). Les méthodes d'analyse doivent être déterminées en fonction de l'équipement disponible et des analytes cibles définis. Encore une fois, il est essentiel de signaler les analytes mesurés afin de pouvoir comparer les données d'essais entre les laboratoires.

L'élaboration de ces méthodes a nécessité la mise en commun d'un important ensemble de données. Les principales constatations ont démontré que les solutions WAF et CEWAF ont une toxicité semblable en fonction des concentrations mesurées de composés semi-volatils et volatils, que les expositions additionnées sont moins toxiques que les expositions constantes, et que le pétrole altéré est moins toxique que le pétrole non altéré (Aurand et Coelho 2005).

Le Comité du CROSERF a étudié plusieurs sujets lors de l'élaboration des méthodes, y compris la charge variable par rapport à la dilution en série et les enceintes d'essai ouvertes ou fermées. Il a conclu qu'il n'est pas possible de recommander la charge variable plutôt que la dilution en série et vice versa. Malgré un risque de surestimer la toxicité, les enceintes fermées ont été recommandées plutôt que les enceintes ouvertes, qui ont donné des résultats moins uniformes en raison de la variabilité de l'évaporation (Aurand et Coelho 2005). Le Comité a également conclu que les protocoles pourraient être modifiés afin d'inclure différents taux de dilution et d'autres enceintes d'exposition que ceux élaborés par le CROSERF (Aurand et Coelho 2005).

3.4.3 Modifications recommandées aux méthodes normalisées, et justification

Des modifications ont été apportées aux protocoles afin de les adapter à des objectifs autres que ceux des initiatives initiales du CROSERF (p. ex., Barron et Ka'aihue 2003), étant entendu que le CROSERF visait avant tout à élaborer des protocoles normalisés pour réduire les différences dans les résultats des essais de toxicité des dispersants et des hydrocarbures dispersés entre les laboratoires.

Par exemple, il y a eu des débats intenses au sujet des méthodes permettant de créer des expositions progressives aux hydrocarbures. Le CROSERF a recommandé d'utiliser un gradient de charge variable, obtenu en préparant les solutions selon une série décroissante de ratios pétrole:eau. Pour leur part, Barron et Ka'aihue (2003) préconisaient les dilutions variables, c.-à-d. des gradients de concentration obtenus par les dilutions d'un stock de solutions d'essai préparées à l'aide d'un seul ratio pétrole/eau. Les deux méthodes ont donné des expositions et des toxicités différentes. Les charges variables produisent des ratios pétrole:eau qui reproduisent les conditions d'un déversement en eaux libres. Cependant, il existe des différences entre les traitements dans la composition des hydrocarbures de la phase aqueuse du pétrole en raison des différentes solubilités des hydrocarbures. De même, les charges variables ne modélisent pas la dilution après le mélange d'une nappe de surface dans la colonne d'eau. Ces différences compliquent l'interprétation et les comparaisons de la toxicité mesurée entre les différentes huiles. Les dilutions variables favorisent une composition chimique uniforme et la comparabilité des solutions d'essai d'hydrocarbures dispersés, et elles sont plus simples à préparer.

Barron et Ka'aihue (2003) recommandent également de modifier les protocoles définis par le CROSERF pour faciliter les essais des agents de dispersion avec des espèces subarctiques, dans des conditions subarctiques, y compris des températures plus basses et des périodes d'exposition plus longues (résumé, encadré 4). Ces modifications ont été justifiées par les différences environnementales entre des conditions subarctiques (p. ex., rayonnement UV, température) et les conditions possibles lors d'un déversement (p. ex., ration dispersant/pétrole de 1:10). La méthode consistant à diluer la WAF à de faibles concentrations dans la méthode à

flux constant du CROSERF pourrait sous-estimer la persistance du pétrole dans les environnements de l'Arctique. À l'inverse, dans des environnements subarctiques, les récipients d'essai scellés prescrits pourraient allonger l'exposition aux hydrocarbures mono-aromatiques, qui sont vraisemblablement perdus dans les 48 premières heures qui suivent un déversement à des températures plus élevées (Barron et Ka'aihue 2003).

Barron et Ka'aihue (2003) recommandent également d'ajouter un régime de rayonnement UV 24 heures après le début de l'exposition au pétrole pour mettre à l'essai l'exposition potentielle aux composantes phototoxiques. De plus, des précisions supplémentaires sur la charge de

Encadré 4

Modifications recommandées aux protocoles du CROSERF pour les essais de toxicité du pétrole dispersé dans des conditions arctiques (Barron et Ka'aihue 2003)

- Mettre à l'essai du pétrole frais et modérément altéré dans des conditions d'énergie de mélange modérée
- Mettre à l'essai le Corexit 9500 et le Corexit 9527 selon des ratios élevés dispersant:pétrole
- Préparer les solutions d'essai avec des dilutions variables plutôt que des charges variables
- Utiliser des expositions statiques dans les enceintes ouvertes
- Allonger la durée de l'essai de 4 à 7 jours pour évaluer la mortalité retardée
- Quantifier environ 40 hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et leurs homologues alkyles dans les solutions d'essai de toxicité
- Réaliser les essais sur des larves de hareng du Pacifique, une espèce d'oursin et un copépode calanoïde dans des conditions subarctiques de température et de salinité
- Évaluer le potentiel de phototoxicité accrue en intégrant des expositions limitées à la lumière du soleil ou à une lumière du soleil naturelle simulée
- Intégrer un paramètre de bioaccumulation en mesurant les concentrations d'HAP dans les tissus des copépodes

pétrole dans l'eau pourraient englober le signalement de l'épaisseur de la couche de pétrole flottant pendant la préparation des solutions du stock. Bon nombre des modifications recommandées ont amélioré le protocole en le rendant plus pratique (p. ex., en utilisant des enceintes ouvertes) et en abandonnant les scénarios « réalistes » pour des « scénarios de la pire éventualité » (p. ex., phototoxicité accrue; ratios pétrole:eau plus élevés).

Le CNR (2005) a recommandé d'apporter les modifications suivantes au protocole du CROSERF :

- Préparer les solutions WAF et CEWAF avec des énergies de mélange équivalentes;
- Offrir une certaine souplesse dans le choix des différentes enceintes d'essai dans la mesure où elles sont uniformes pour toutes les expositions;
- Des directives supplémentaires sur les exigences relatives à l'analyse chimique des solutions d'essai et les régimes d'échantillonnage, le calcul des paramètres et le calcul des unités toxiques;
- D'autres méthodes pour mettre à l'essai la phototoxicité accrue par les rayonnements UV.

Clark *et al.* (2001) ont recommandé des énergies de mélange égales pour préparer les solutions WAF et CEWAF, en notant que, même si la variabilité sera plus grande dans les solutions du stock WAF contenant des particules d'hydrocarbures, ce scénario est plus réaliste en cas de déversement. Le CNR (2005) a également recommandé de modifier le protocole pour

les concentrations décroissantes d'hydrocarbures afin d'inclure un taux de diminution plus lent; Aurand et Coelho (2005) ont désigné cette modification comme étant l'ajout le plus utile aux protocoles définis par le CROSERF au moment de leur rapport.

Un examen des publications qui citent le document d'orientation du CROSERF montre qu'on pourrait apporter un certain nombre de modifications à la méthode de base afin de la rendre plus efficace et pragmatique, ou pour répondre aux besoins précis de la recherche (chapitre 4 ci-après). Par exemple, Adams *et al.* (2014a) décrivent une méthode CEWAF à haute énergie (HECEWAF) qui s'applique au mélange à haute énergie de l'eau, du pétrole et de l'agent de dispersion, avec un tourbillon à 100 % suivi d'une sonication. L'objectif était de réduire l'influence de la viscosité élevée des hydrocarbures lourds ou fortement altérés sur leur dispersibilité et leur biodisponibilité. La méthode a produit des solutions du stock riches en pétrole dissous et particulaire et a permis de comparer les huiles en fonction de la toxicité inhérente de leurs constituants, et non de leur toxicité modifiée par les limites physiques à la solubilité.

4 ANALYSE DOCUMENTAIRE

Le chapitre 3 décrit le document d'orientation du CROSERF avec des méthodes de mise à l'essai de la toxicité du pétrole brut dispersé et dispersé chimiquement dans l'eau de mer. Jusqu'à présent, aucune méthode normalisée n'a été élaborée pour d'autres scénarios, comme les déversements en eau douce ou les produits inhabituels comme le pétrole lourd et le bitume dilué. Le chapitre 4 examine les effets potentiels sur les essais de toxicité des hydrocarbures des différents protocoles décrits dans les ouvrages scientifiques consacrés à l'entreposage du pétrole, à la préparation de solutions de pétrole, aux expositions des espèces mises à l'essai, aux analyses chimiques, etc. L'examen appuie les recommandations données dans le chapitre 5 concernant les modifications à apporter au document d'orientation du CROSERF dans un cadre proposé et la recherche à entreprendre pour étudier les inconnues fondamentales.

Encadré 5
Liste des mots clés dans l'analyse documentaire

- HAP, toxicité, agent de dispersion du pétrole
- dispersant, Corexit, toxicité chimique
- dispersant, Corexit, toxicité
- Corexit, pétrole, toxique, poisson
- toxicité des agents de dispersion du pétrole chez les poissons
- toxicité pour les poissons, pétrole brut
- CEWAF, toxicité, poisson
- HAP, essais de toxicité des hydrocarbures
- toxicité des hydrocarbures
- toxicité, agent de dispersion, pétrole brut, poissons
- essai de toxicité des hydrocarbures, Corexit
- AMOP, CEWAF
- IOSC, CEWAF
- SETAC, CEWAF
- examen des méthodes CEWAF, IOSC

4.1 MÉTHODES D'ANALYSE DOCUMENTAIRE

Cette analyse comprenait des recherches dans les bases de données à l'aide de critères de recherche prédéterminés, en mettant l'accent sur les rapports à comité de lecture sur les essais de toxicité du pétrole et des méthodes d'essai sur les poissons. Les bases de données examinées incluaient Google Scholar, Web of Science et les catalogues des bibliothèques de l'Université Queen's (mots clés dans l'encadré 5). La portée de cette analyse a été limitée aux méthodes de laboratoire pour les essais de toxicité du pétrole sur les poissons. Ces études sont nombreuses et fournissent des renseignements importants sur les avantages

et les inconvénients des méthodes disponibles, les lacunes dans les connaissances et les domaines de recherche futurs. L'analyse a été également restreinte aux essais dans lesquels le pétrole est mélangé à de l'eau, ou dans lesquels ses composantes sont ajoutées par des systèmes de mélange sélectif compartimenté aux substrats mazoutés. Les sédiments contaminés par le pétrole peuvent également être une source d'hydrocarbures d'origine hydrique et d'exposition directe pour les espèces qui filtrent ou consomment des sédiments (p. ex., l'alose noyer (*Dorosoma cepidianum*)). Bien que l'exposition des espèces benthiques au pétrole lourd et au bitume dilué associés aux sédiments soit une préoccupation majeure en raison de leur propension à couler, le présent rapport ne comprend pas de méthodes d'essai de toxicité des sédiments. L'analyse a également exclus les essais sur de l'eau contaminée par du pétrole provenant d'expériences ou de réels déversements de pétrole.

Les éléments des méthodes d'essai de toxicité ont été répartis en quatre catégories : méthodes de préparation des solutions d'essai; méthodes de caractérisation du pétrole et des solutions d'essai; régime d'exposition; résultat de l'essai. Les analyses et statistiques descriptives pour chacune de ces quatre catégories sont présentées ci-après. Si une publication n'a pas signalé un élément, il a été classé dans la catégorie **NP**, information non précisée. Les éléments qui n'étaient pas applicables aux méthodes présentées dans la publication ont été désignés comme étant sans objet, **S.O.**

La compilation des données a été limitée aux éléments des protocoles explicitement décrits dans chaque publication. Les méthodes tirées d'autres publications ont été incluses uniquement si elles étaient décrites de manière suffisamment détaillée pour être suivies, telles qu'elles étaient décrites. Cette approche pourrait avoir augmenté le nombre d'entrées **NS**.

Le résumé de la documentation est donné dans l'encadré 6. Les nombres dans chaque catégorie ne correspondent pas, car plusieurs essais (p. ex., les hydrocarbures, les espèces) figurent dans de nombreux documents. La plupart des articles ont été publiés dans les six dernières années (Figure 2), ce qui reflète vraisemblablement l'intérêt pour les recherches après des déversements de grande ampleur, comme l'explosion du puits de la plateforme Deepwater Horizon, et le financement qui leur a été accordé. Le plus ancien document inclus dans l'analyse a été publié en 1973 et le plus récent, en 2016.

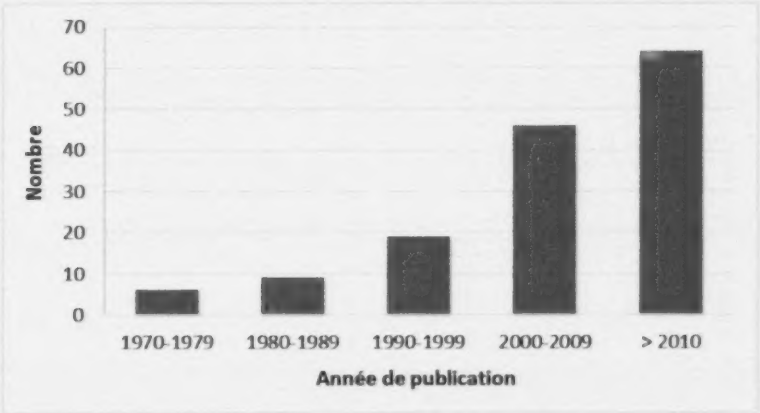

Figure 2 : Nombre de documents inclus dans l'analyse documentaire, par année de publication. Tranches d'années entre 1973 et 2016 (N = 144).

4.1.1 Détermination des facteurs expérimentaux qui ont une incidence sur le résultat des essais de toxicité

L'analyse couvre principalement les essais de toxicité effectués au moyen d'expositions WAF et CEWAF, puisque ce sont celles qui sont visées par le CROSERF. La concentration et la composition des solutions WAF et CEWAF sont principalement touchées par la charge en hydrocarbures de l'eau, le ratio dispersant/hydrocarbures (ratio dispersant/pétrole), la température, ainsi que l'énergie et la durée du mélange. Les agents de dispersion accroissent la biodisponibilité du pétrole en augmentant le ratio surface/volume des gouttelettes de pétrole, en augmentant leur stabilité dans la phase aqueuse et en maximisant la séparation des hydrocarbures dans l'eau (p. ex., Ramachandran *et al.* 2004; Schein *et al.* 2009; Wu *et al.* 2012; Martin *et al.* 2014). Les huiles lourdes peuvent sembler moins toxiques que les huiles plus légères, à des concentrations similaires des composants toxiques, puisque leur viscosité plus élevée limite la formation de petites gouttelettes dans les conditions des énergies de mélange plus faibles typiques de la préparation des solutions WAF.

Pour évaluer l'impact des facteurs expérimentaux sur le résultat de l'essai, tous les facteurs doivent demeurer inchangés, sauf pour l'une des variables évaluées, mais peu d'études ont systématiquement évalué les effets de chaque facteur sur les résultats des essais. Echols *et al.* (2016b) ont comparé la létalité aiguë de trois différentes huiles pour la forme juvénile de *Menidia beryllina* et la mysis (*Americamysis bahia*) afin d'évaluer l'influence des quatre variables prescrites dans la méthode du CROSERF (Singer *et al.* 2001) : enceintes d'essai statique ouvertes ou fermées, diluants aqueux naturels ou synthétiques, eau aérée ou non aérée, et solutions WAF préparées avec une énergie de mélange faible (LEWAF; pas de tourbillon) et moyenne (MEWAF; tourbillon de 25 %). Les huiles mises à l'essai comprenaient un échantillon non altéré et deux échantillons altérés du déversement de pétrole de la plateforme Deepwater Horizon. Dans l'ensemble, le pétrole non altéré présentait une létalité plus aiguë que les hydrocarbures altérés, correspondant à des concentrations plus élevées d'hydrocarbures de faible poids moléculaire dans les solutions d'essai. Les crevettes étaient plus vulnérables à une exposition au pétrole que les poissons, mais de nombreux essais réalisés sur des poissons n'ont pas été concluants, car des CL50 après 96 h dépassaient 100 % des solutions WAF dans la plupart des essais avec le pétrole altéré et non altéré. La composition des solutions LEWAF n'a pas changé lorsque les solutions ont été préparées avec de l'eau de mer naturelle, du carbone et de l'eau de mer microfiltrée ou de l'eau de mer synthétique plutôt qu'avec des sels Instant Ocean. Même si la nature de l'eau de dilution n'a pas changé la toxicité du pétrole altéré ou non altéré pour les poissons, les crevettes étaient plus sensibles aux hydrocarbures dans l'eau salée artificielle et filtrée que dans l'eau salée naturelle; la cause de cette différence n'a pas été expliquée. La toxicité du pétrole non altéré a augmenté d'environ 50 %, avec l'augmentation de l'énergie de mélange, correspondant aux concentrations plus élevées d'hydrocarbures dans les solutions MEWAF que dans les solutions LEWAF. De même, la composition chimique et la toxicité des solutions LEWAF pour les crevettes ont été plus reproductibles que pour les solutions WAF préparées avec une énergie de mélange plus élevée, probablement en raison des concentrations moindres des hydrocarbures particulaires. Comparativement aux récipients d'essai fermés, il y avait une perte de C1- et C2-naphtalènes dans les solutions de pétrole non altéré des récipients d'essai ouverts, ce qui indique une altération et correspond à une réduction de la toxicité pour les crevettes. Une légère aération des solutions d'essai n'a eu aucun effet sur la toxicité. Bien que ces expériences aient fourni des indications sur les méthodes d'essai, en particulier avec les crevettes, les conclusions quant à l'effet des variables d'essai sur la toxicité pour les poissons ont été affaiblies par la faible létalité aiguë des huiles mises à l'essai et l'absence de tests statistiques des effets du traitement. Lorsque les CL50 après 96 h dépassaient 100 % des dilutions de solutions WAF, il n'y avait pas de fondement pour évaluer les effets du traitement.

Rhonton *et al.* (2001) ont comparé la toxicité aiguë du pétrole brut Alaskan North Slope (ASNC) altéré et dispersé chimiquement pour les larves de poissons estuariens (*Menidia beryllina*) dans des expositions additionnées et des expositions continues de 96 heures. Pour des charges nominales en hydrocarbures, les solutions CEWAF étaient plus toxiques que les solutions WAF et les expositions continues étaient plus toxiques que les expositions additionnées. Néanmoins, lorsque l'on exprimait les CL50 après 96 h sous la forme des hydrocarbures pétroliers totaux mesurés, les valeurs de CL50 après 96 h d'exposition continue aux solutions WAF et CEWAF étaient semblables pour les deux états altérés du pétrole ANSC. De même, la toxicité aiguë des solutions WAF du pétrole brut de la baie Prudhoe non altéré et altéré artificiellement était moins grande que celle des solutions CEWAF si l'on se fonde sur les charges nominales, mais les deux toxicités étaient égales lorsque l'on prend les concentrations mesurées des hydrocarbures (Singer *et al.* 2001b). Redman et Parkerton (2015) ont examiné les méthodes des essais de toxicité du pétrole et de calcul des CL50 des unités toxiques à partir de l'analyse chimique des solutions d'essai et du modèle PETROTOX. Les toxicités des solutions WAF préparées selon différentes méthodes se chevauchaient lorsqu'elles étaient exprimées en tant que concentrations mesurées et unités toxiques (UT) des hydrocarbures, en particulier lorsque les solutions d'essai étaient caractérisées par des dispositifs d'échantillonnage passif qui amélioraient les limites de détection. De même, pour la toxicité chronique, les solutions CEWAF de quatre pétroles bruts (Wu *et al.* 2012), du carburant diesel (Schein *et al.* 2009) et du mazout lourd (Adams *et al.* 2014b) étaient plus toxiques pour les embryons de truite que les solutions WAF correspondantes lorsqu'elles sont exprimées en pourcentage de dilution (concentration nominale), mais pratiquement les mêmes lorsqu'elles sont exprimées en concentrations mesurées d'HAP totaux ou d'hydrocarbures pétroliers totaux mesurés par fluorescence (TPH-F) dans la solution.

En revanche, la toxicité chronique des solutions CEWAF préparées à partir de mazout lourd était inférieure à celle des solutions WAF générées par une colonne de gravier mazouté, même lorsque la toxicité était exprimée sous la forme de concentrations mesurées de TPH-F (Martin *et al.* 2014). La raison apparente est due aux différences dans la composition des solutions d'essai. Les hydrocarbures présents dans les solutions CEWAF sont des huiles particulaires et dissoutes, à la composition semblable à celle du pétrole en vrac. Pour leur part, les solutions WAF produites à partir de colonnes mazoutées étaient principalement composées d'hydrocarbures dissous, avec une distribution différente des HAP à partir de l'huile mère. Cela illustre un biais courant dans les rapports sur les concentrations de pétrole provoquant une toxicité, puisque les échantillons d'eau extraits avec un solvant introduisent à la fois les phases dissoutes et particulaires des hydrocarbures dans les solutions d'essai. Par conséquent, la toxicité des composantes dissoutes des solutions de pétrole (p. ex., les BTEX pour la létalité aiguë, les HAP pour la toxicité chronique) peut être sous-estimée. Cet élément confirme la recommandation de Redman et Parkerton (2015) d'utiliser des dispositifs d'échantillonnage passif qui ciblent la composante dissoute des solutions d'essai d'hydrocarbures.

Tsvetnenko et Evans (2002) ont évalué l'incidence de l'énergie de mélange, de la durée du mélange et du ratio volume/interface des hydrocarbures flottants sur la composition des solutions WSF préparées à partir de pétroles bruts légers (42 °API et 48 °API), moyens (34 °API) et lourds (21 °API) et d'un condensat de gaz naturel (44 °API), et sur la toxicité connexe pour les algues unicellulaires. L'objectif était de déterminer les aspects des méthodes normalisées qui ont une influence sur les résultats des essais en laboratoire effectués avec des huiles inhabituelles, plus précisément les pétroles bruts hautement volatils du plateau du nord-ouest de l'Australie. La méthode normalisée consiste à préparer des solutions WSF en mélangeant les hydrocarbures dans de l'eau de mer naturelle (salinité de 35 ppm) filtrée et stérilisée pendant 20 heures, et en exposant des algues unicellulaires à la phase aqueuse pendant 96 heures. Les auteurs ont constaté que :

- Les solutions WSF générées dans des bouteilles cylindriques d'un litre avec un ratio pétrole/eau fixe de 1:9, un volume total moins grand de pétrole et d'eau, une couche plus mince de pétrole sur l'eau et un espace de tête accru atteignaient la concentration d'hydrocarbures maximale trois fois plus vite que les préparations réalisées avec de plus grands volumes de pétrole et d'eau;
- L'augmentation de 140 à 540 tr/min de la vitesse de rotation du barreau d'agitation accroît la profondeur du tourbillon pour tous les barreaux testés (25, 34, 38, 49 mm de long, biseau de 51 mm, disque de 35 mm). La taille recommandée du barreau d'agitation pour un tourbillon stable était de 34 mm à 160-190 tr/min. L'énergie appliquée pour atteindre une profondeur de tourbillon donnée dépendait de la taille du barreau d'agitation;
- Les concentrations d'hydrocarbures lourds dans les solutions WSF ont augmenté constamment au cours de 600 heures de mélange, tandis que d'autres huiles ont atteint une charge maximale en 24 heures. L'augmentation de la température du mélange a réduit le temps pour atteindre la concentration maximale de la solution WSF, mais les températures ne devraient pas dépasser celle de l'essai de toxicité;
- La toxicité de la solution WSF du pétrole le plus léger n'a pas changé après 24 à 240 heures de brassage continu, malgré les différences dans la composition chimique attribuables à la volatilisation des hydrocarbures avant et pendant les essais de toxicité; au bout du compte, on a obtenu des concentrations semblables d'hydrocarbures et des toxicités similaires.

Les expositions statiques sont plus économiques, mais il faut créer des solutions d'essai qui changent en 24 heures si elles sont mises en œuvre avec un régime de renouvellement quotidien (Echols *et al.* 2016b). Les récipients à flux continu fermés hermétiquement accroissent la fraction aromatique volatile (avec d'autres composés volatils) dans les solutions WAF, ce qui peut surestimer la toxicité de cette fraction dans les déversements réels où l'altération réduit rapidement les concentrations. Le renouvellement statique quotidien peut également surestimer la toxicité, car le dosage quotidien ne reproduit pas des scénarios typiques de déversement en mer. Cependant, l'éruption du puits de la plateforme Deepwater Horizon et le déversement de bitume dilué dans la rivière Kalamazoo à partir du pipeline ont démontré qu'il n'existe pas de scénario de déversement « unique ». Comme c'est le cas pour tous les déversements, les conditions varient considérablement en fonction de la source et de la nature du pétrole, de la fréquence et de la durée du rejet et des conditions environnementales qui contrôlent le devenir du pétrole, la distribution et l'exposition des récepteurs (Lee *et al.* 2015).

En général, on s'est peu intéressé aux facteurs liés à la qualité de l'eau (pH, température, oxygène dissous) pour les essais. Les lecteurs doivent supposer que ces paramètres ont été optimisés et qu'ils ont fait l'objet d'un suivi, car ils peuvent modifier les résultats des essais en changeant le devenir et le comportement du pétrole et les réactions des organismes mis à l'essai.

Besoins en recherche

- Évaluer le devenir, le comportement et les effets du bitume dilué dans l'eau douce, l'eau de mer et l'eau saumâtre, et dans des conditions tempérées et arctiques.
- Comparer le comportement et la toxicité du bitume dilué dans l'eau de mer, l'eau saumâtre et l'eau douce, y compris dans les eaux riches en acides humiques ou à très faible alcalinité (ainsi que selon la dureté totale, le pH et d'autres paramètres).
- Mettre à l'essai des pétroles bruts légers et lourds à plusieurs états d'altération afin de déterminer la façon dont la composition chimique et la toxicité des solutions d'essai changent avec les durées et les températures de mélange à différents moments au cours d'un déversement.
- Pour créer une perspective sur le risque relatif, comparer la toxicité du bitume dilué à celle de pétroles bruts classiques déjà testés, en utilisant les mêmes méthodes normalisées pour préparer les solutions d'essai et mesurer la toxicité.
- Élaborer des méthodes normalisées pour évaluer la toxicité du bitume dilué incorporé dans les sédiments.
- Appliquer le fractionnement chimique axé sur les effets (FCAE) afin de déterminer les composantes toxiques du pétrole.
- Élaborer des distributions de la sensibilité des espèces en fonction des essais normalisés de toxicité du pétrole.
- Évaluer les contributions à la toxicité des produits issus de la photodégradation et de la biodégradation et des matières organiques extractibles à l'acide.

Il est probable que les conditions d'essai ont également des répercussions sur le résultat des essais de toxicité du bitume dilué, mais à ce jour, aucune étude systématique n'a été réalisée.

4.1.2 Hydrocarbures mis à l'essai

L'altération du bitume dilué et des autres produits pétroliers durant la préparation des solutions d'essai et de stock a des effets importants sur la dispersion du pétrole et la composition des solutions WAF et CEWAF. La densité API du bitume dilué diminue considérablement avec l'altération, un processus qui modifie énormément son comportement, son devenir et sa composition chimique (Chapitre 2). Par exemple, la densité API du bitume dilué CLB est 22,6 °API; il est donc classé comme un pétrole moyen, juste au-dessus du seuil de 22,3 °API qui définit les pétroles lourds. La densité API du bitume non dilué de Cold Lake varie de 9,8 à 13,2 °API (EC 2016), ce qui donne à penser que, lorsque le bitume dilué CLB s'altère et perd ses composés volatils solvants, il deviendra un pétrole lourd avec une gravité API plus basse. Quelques articles ajoutent ces détails dans la description des huiles utilisées. *La gravité API doit être déclarée pour toutes les huiles mises à l'essai, si elle est connue, ou calculée à partir de la gravité spécifique.*

Les 144 documents ont signalé l'étude d'au moins une huile (critères d'inclusion), mais certains en ont étudié plusieurs, et représentent ensemble 75 huiles différentes (Figure 3). L'huile la plus souvent testée était le pétrole brut Alaskan North Slope (**ANSC**), ce qui reflète le vif intérêt suscité par le déversement en 1989 de l'*Exxon Valdez* dans le golfe du Prince William, ainsi que la disponibilité des huiles pour les essais. Parmi les autres huiles fréquemment mises à l'essai, on peut citer le diesel (**DSL**), le pétrole brut léger d'Arabie (**ALC**), le pétrole brut de la baie Prudhoe (**PBCO**), le mazout n° 2 (**N2FO**), le pétrole brut moyen d'Amérique du Sud (**MESA**), le pétrole brut non corrosif du sud de la Louisiane (**SLS**) et le pétrole brut Macondo (**MAC**). Le nombre d'études sur le MAC augmente rapidement au fur et à mesure de la

publication des recherches menées à la suite du déversement de la plateforme Deepwater Horizon en 2010. Plus de 50 % des hydrocarbures ont été étudiés quatre fois ou moins et ont été classés dans la catégorie **Autre**. Lorsque les hydrocarbures sont regroupés par type (p. ex., le pétrole brut, le mazout lourd, le bitume dilué), l'huile mise à l'essai le plus fréquemment (>70 %) est le pétrole brut, suivi du carburant diesel et des mazouts lourds.

Dans cette analyse, les huiles les plus souvent mises à l'essai ont également été classées comme légères, moyennes ou lourdes en fonction de la valeur de leur gravité API. La majorité des rapports n'ayant pas indiqué de valeur de gravité API, le pétrole a alors été classé par des renvois aux valeurs de la gravité API tirées de la base de données sur les propriétés des hydrocarbures, tenue par le Centre de technologie environnementale d'Environnement Canada (2016), de la Convention MARPOL (2005) ou de Dietrich *et al.* (2014). Il est important de noter que la gravité API n'est pas une valeur fixe pour chaque pétrole, mais qu'elle varie en fonction de l'altération, de la température et de la base de données ou de la source, de sorte que certaines huiles proches des limites entre deux catégories peuvent appartenir à plus d'une catégorie.

Cinq des huit pétroles les plus couramment étudiés (DSL, MAC, SLS, N2FO et ALC; figure 3) ont été classées comme légères, et les trois autres (ANSC, MESA et PBCO) comme moyennes. L'abondance des essais effectués sur les pétroles légers reflète leur valeur élevée et les grandes quantités expédiées. Au fur et à mesure que la production de pétroles légers diminuera à l'avenir, il y aura probablement une dépendance accrue à l'égard des pétroles moyens et lourds comme le bitume dilué, les volumes expédiés augmenteront et on s'intéressera davantage aux essais de toxicité et aux ÉRÉ, en particulier pour les écosystèmes d'eau douce au Canada.

Seuls 22 des 144 articles ont comparé la toxicité et les caractéristiques chimiques entre plusieurs types de pétroles; les mazouts (**N2FO**, **HFO**, etc.) et les pétroles bruts **ANSC**, **ALC** et **MESA** ont été mentionnés à maintes reprises. Quinze de ces études ont comparé la toxicité entre les pétroles lourds, moyens et légers. Notons une comparaison des pétroles plus lourds à viscosité élevée (MESA, Terra Nova) au pétrole brut plus léger et moins visqueux néo-écossais (Scotian Light) (Ramachandran *et al.* 2004; Wu *et al.* 2012), une comparaison de la toxicité chronique des solutions WAF et CEWAF du MESA et du HFO 7102 pour les embryons de hareng de l'Atlantique et de la truite arc-en-ciel, respectivement (Adams *et al.* 2014b), et une comparaison du bitume dilué au pétrole moyen composite sulfureux et au mélange de bruts légers non corrosifs (Philibert *et al.* 2016).

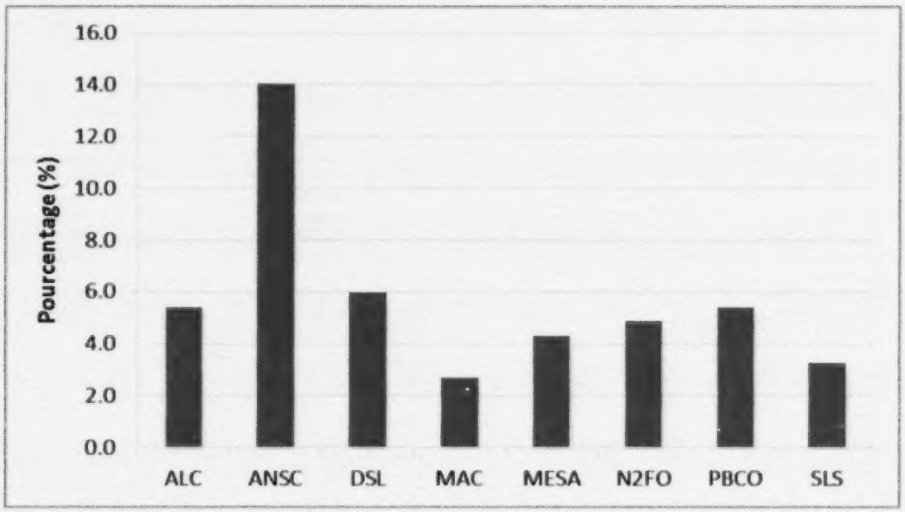

*Figure 3 : Pourcentage des essais de toxicité de différents pétroles bruts. Pétrole brut Alaskan North Slope (**ANSC**), pétrole brut léger d'Arabie (**ALC**), diesel (**DSL**), brut de la baie Prudhoe (**PBCO**), mazout n° 2 (**N2FO**), brut moyen d'Amérique du Sud (**MESA**), mazout lourd (**HFO**), brut Macondo (**MAC**), brut non corrosif du sud de la Louisiane (**SLS**) et brut de la mer du Nord (**NSC**) (N=185 entrées de pétrole). Les huiles classées comme **Autre** sont celles qui sont mentionnées dans quatre publications ou moins et qui n'ont pas été incluses dans le graphique (N=100).*

4.1.3 État d'altération des huiles mises à l'essai

L'altération des hydrocarbures entraîne des changements dans la composition chimique résultant de processus tels que la volatilisation, la dissolution des composants hydrosolubles, la biodégradation, l'émulsification, l'absorption de matières solides ou d'eau et/ou la photooxydation (Dew *et al.* 2015). Il est probable que les processus d'altération importants surviennent à toutes les étapes des essais de toxicité, de la réception de l'huile aux derniers essais en laboratoire. Cela est particulièrement pertinent pour le bitume dilué, qui perd rapidement les composantes de faible poids moléculaire de ses diluants sous l'effet de la volatilisation (chapitre 2).

Malheureusement, la composition détaillée des pétroles mis à l'essai est rarement indiquée et les termes « altéré » ou « non altéré » ne représentent pas avec exactitude l'état d'un pétrole mis à l'essai. L'altération représente un continuum des modifications de la composition qui se produisent pendant l'entreposage, la manipulation, la préparation et la mise à l'essai des solutions d'hydrocarbures. Les termes les plus appropriés pour les huiles devraient être « moins altérée » et « plus altérée », mais les données analytiques indiquées sont généralement insuffisantes pour appuyer ces classifications. Pour les trois rapports sur la toxicité du bitume dilué examinés dans le chapitre 2, le bitume dilué a été classé comme étant « non altéré », mais il est probable que l'altération a eu lieu pendant l'entreposage, la manipulation et la mise à l'essai.

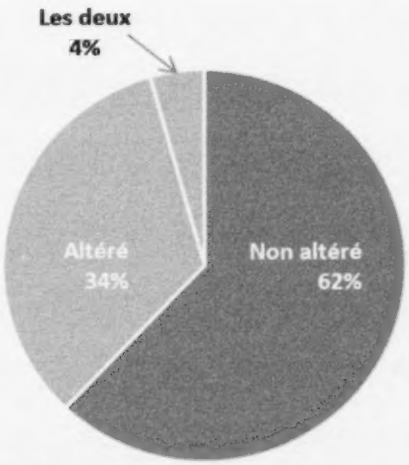

*Figure 4 : Pourcentage de publications qui ont utilisé des pétroles qui n'avaient pas subi d'altération (**Non altéré**) ou qui avaient subi une altération (**Altéré**). Si aucun état d'altération n'a été précisé dans le texte, on présume que le pétrole était non altéré. Si un pétrole a été mis à l'essai dans plusieurs états d'altération, ce pétrole a été classé comme étant **à la fois** altéré et non altéré (N = 185 entrées).*

Les 185 pétroles mis à l'essai entre toutes les études ont été classées en fonction de leur état au cours de l'essai : **Non altérée**, **Altérée** ou **Les deux** (Figure 4). Si plusieurs huiles ont été mises à l'essai dans la même étude, chacune a reçu une classification personnalisée. Si l'état de l'huile n'était pas expressément décrit, on a présumé qu'elle était non altérée, ce qui a créé un biais en faveur du nombre d'huiles non altérées. L'huile était classée comme altérée si elle avait été altérée ou si elle avait été manipulée d'une manière qui entraînerait une altération durant l'expérience. La plupart des huiles mises à l'essai (62,2 %) étaient non altérées et 33,5 % étaient altérées.

Un petit nombre de rapports comparent les versions altérée et non altérée du même pétrole afin d'examiner précisément l'altération. Gonzalez-Doncel *et al.* (2008) ont étudié les effets du pétrole brut Prestige non altéré et altéré sur le développement embryo-larvaire du médaka japonais, et ont constaté que, même si l'exposition aux deux états induisait des troubles de croissance, les HAP totaux étaient plus élevés dans le pétrole non altéré que dans le pétrole altéré et correspondaient à une toxicité supérieure. *Les rapports d'essais de toxicité devraient comprendre des analyses chimiques de l'huile mise à l'essai, de préférence au début et à la fin du programme d'essais de toxicité.*

Bien que le CROSERF ait recommandé de suivre la méthode ASTM D86 ou D2892 pour altérer le pétrole artificiellement, il ne faut pas utiliser de températures supérieures à 130 °C pour éviter de modifier l'huile chimiquement, y compris par la déshydratation des cycloalcanes et la rupture de liaisons chimiques. Dans des conditions de distillation sous vide (méthode ASTM D1160), la température maximale recommandée est 200 °C (H. Dettman, Ressources naturelles Canada, communication personnelle). De nombreuses méthodes *ponctuelles* ont été mentionnées, comme le pétrole brut altéré ANS 521 préparé en chauffant du pétrole brut ANSC à 521 °F (272 °C), une technique décrite dans Bidwell *et al.* (2003) qui peut dégrader les hydrocarbures et modifier leur composition chimique et leur toxicité. L'origine, l'état d'altération et les méthodes détaillées d'altération expérimentale des huiles mises à l'essai doivent être clairement décrits dans les études sur la toxicité du pétrole altéré afin qu'il soit possible de comparer les résultats entre les études et de les utiliser dans les ÉRÉ.

Besoins en recherche

- Évaluer les effets de l'altération du pétrole pendant la préparation des solutions sur la densité (gravité API) et la viscosité du pétrole mis à l'essai, sur la composition chimique des solutions d'essai préparées selon des méthodes normalisées, et sur la toxicité mesurée du pétrole, afin de déterminer les biais potentiels dans les résultats des essais et les conséquences de l'altération sur le devenir dans l'environnement et les effets lors de déversements réels.
- Caractériser **la nature** et la portée des changements physiques et chimiques afin de mettre les pétroles à l'essai dans différentes conditions de stockage, et les effets potentiels sur le résultat des essais de toxicité.

Même lorsque les études portent sur un pétrole non altéré, il est probable que ces produits sont altérés, dans une certaine mesure, pendant la manipulation, la préparation des solutions d'essai et l'entreposage en raison de la perte rapide des composantes de faible poids moléculaire. L'altération va entraîner une modification de la viscosité de l'huile, de sa dispersion dans l'eau, de la séparation des hydrocarbures dans l'eau et des mesures de la toxicité. *Par conséquent, il est essentiel d'évaluer l'altération en mesurant le poids et les caractéristiques physiques et chimiques au début et à la fin des expériences. Des recherches sont nécessaires afin de déterminer les paramètres qui indiquent l'altération pendant les essais et la façon dont l'altération pourrait influer sur la toxicité.*

4.2 MÉTHODES DE PRÉPARATION DES SOLUTIONS D'ESSAI

4.2.1 Méthodes fréquemment citées de préparation des solutions d'essai

Nous avons relevé les méthodes citées de préparation de solutions d'essai pour chaque publication afin de déterminer les plus influentes. Seuls quelques articles (<13 %) n'ont pas cité d'autres méthodes dans leur description de la préparation des solutions d'essai, et le nombre de citations d'autres méthodes variait de 1 à > 10.

Les méthodes citées le plus souvent sont celles de Singer *et al.* (2000) et d'Anderson *et al.* (1974), probablement parce qu'elles sont associées au processus de normalisation. De nombreux documents mentionnent des méthodes qui reprenaient des éléments de ces deux sources. Les publications ont été classées comme ayant cité la méthode du CROSERF si elles mentionnent directement le CROSERF, y compris le rapport final d'Aurand et Coelho (2005), ou de façon indirecte si la publication fait référence à une version modifiée de la méthode du CROSERF, comme Singer *et al.* (2000). Sur les 144 publications analysées, 30 (20,8 %) ont cité la méthode du CROSERF, sept directement et 23 indirectement. Bien que de nombreuses publications mentionnent les méthodes du CROSERF, la plupart ne donnent pas tous les détails précis ou ne justifient pas toutes les modifications signalées, et on ne peut que présumer que la méthode a été réellement suivie telle qu'elle est décrite. Il est extrêmement important que toutes les méthodes soient décrites en détail, en particulier les modifications apportées aux protocoles cités. Les rapports devraient également inclure toutes les caractéristiques pertinentes de l'essai, de la nature des organismes mis à l'essai aux concentrations mesurées d'hydrocarbures dans l'eau (voir les directives sur les rapports dans le tableau 7 et à l'annexe 4). L'élaboration et l'utilisation de méthodes normalisées ne garantissent pas non plus que les tests produiraient des données de grande qualité. L'évaluation de la qualité des données ne relève pas de la portée du présent rapport. Certains documents d'orientation sont utiles pour l'évaluation des études écotoxicologiques (p. ex., Harris *et al.* 2014) et des essais de toxicité du pétrole (p. ex., Redman et Parkerton 2015).

Quelques articles ont indiqué les modifications apportées aux méthodes du CROSERF (chapitre 3) de façon suffisamment détaillée pour qu'il soit facile de répéter les méthodes modifiées (p. ex., Barron et Ka'aihue 2003; Hemmer 2011). Gardiner *et al.* (2013), qui ont décrit la façon dont le protocole a été modifié afin de tester la toxicité du pétrole pour des espèces de l'Arctique dans des conditions de l'Arctique (voir la section 4.2.2), sont une exception. Ils ont énuméré les modifications et fourni des descriptions de chaque élément de la méthode, y compris les espèces mises à l'essai, la température, les ratios pétrole:eau et dispersant:hydrocarbure, l'exposition additionnée, la durée du test prolongé et la fréquence des analyses chimiques des solutions d'essai.

Plusieurs autres méthodes sont assez différentes des protocoles définis par le CROSERF, en particulier des méthodes émergentes pour les essais à flux continu, y compris les solutions WAF préparées par remontée d'eau à travers des substrats mazoutés (Marty *et al.* 1997) et l'introduction d'huile dans de l'eau en mouvement par des jets à haute pression afin de créer des suspensions de pétrole dispersé (Nordtug *et al.* 2011). Comme c'est le cas pour les essais de toxicité statiques, bon nombre des détails de la méthode qui varient entre les publications n'ont pas été systématiquement évalués afin de déterminer leur incidence sur la chimie et la toxicité des solutions d'essai. De plus, dans les groupes de recherche, les méthodes peuvent évoluer au fil du temps sans expérimentation systématique pour tester les effets ou les détails publiés des modifications qui ont été apportées.

Les méthodes utilisées pour préparer les solutions WAF et CEWAF de stock de bitume dilué ont été modifiées à partir de Singer *et al.* (2000) et des solutions WAF ont également été préparées par remontée d'eau à travers des billes de céramique mazoutées (Kennedy et Farrell 2005). Même si aucune modification particulière pour la préparation solutions de stock et d'essai avec le bitume dilué n'a été notée dans ces études, la résistance du bitume dilué à la dispersion chimique et le potentiel d'altération pendant la préparation de l'essai ont été désignés comme étant susceptibles d'avoir contribué aux résultats du test (Madison *et al.* 2015). *Il est recommandé que les études du bitume dilué comprennent les traitements préparés avec des méthodes normalisées comme des témoins afin de tenir compte des caractéristiques physiques du bitume dilué susceptibles de modifier les résultats de l'essai (voir la section 4.2.2, en bas).*

4.2.2 Appareil ou système de mélange pour produire les solutions de stock et d'essai

La toxicité du pétrole dans l'eau dépend des concentrations d'hydrocarbures dans la solution, qui dépendent à leur tour de la quantité, de la distribution par taille et de la stabilité des gouttelettes de pétrole en suspension. L'importance de la méthode de mélange est la mesure dans laquelle elle favorise la séparation des hydrocarbures de la phase huileuse à la phase dissoute, où ils sont biodisponibles pour tester les poissons. Les méthodes de mélange qui fournissent des concentrations plus élevées de petites gouttelettes qui sont stables dans la solution donnent des ratios surface:volume plus élevés pour la séparation et une plus longue période avant que les gouttelettes ne soient plus en suspension (p. ex., par coalescence). Par conséquent, la toxicité est plus étroitement liée aux concentrations mesurées d'hydrocarbures dans les solutions d'essai, et non aux concentrations nominales de pétrole dispersé ajouté à une solution d'essai (Schein *et al.* 2009; Wu *et al.* 2012; Gardiner *et al.* 2013; Adams *et al.* 2014b; Martin *et al.* 2014). Par exemple, Gardiner *et al.* (2013) ont comparé la toxicité de solutions WAF, BWWAF (WAF par impulsions - préparée par secouage intermittent à la main) et CEWAF du pétrole brut ANSC pour la morue arctique et le chabot. Les trois méthodes ont donné des solutions contenant des quantités différentes de gouttelettes d'hydrocarbures. Comparativement aux solutions de stock WAF, les concentrations mesurées des HAP totaux et des hydrocarbures pétroliers totaux étaient de 3,3 et 2,8 fois supérieures dans les solutions BWWAF, et 194 et 119 fois plus importantes dans les solutions CEWAF. La composition des solutions de stock a également changé lorsque les HAP alkylés ont augmenté, passant de 50 %

des HAP totaux (WAF) à 62 % (BWWAF) et à 87 % (CEWAF). Comparativement aux solutions WAF et BWWAF, la proportion d'HAP alkylés dans les solutions CEWAF était plus proche de celle de l'hydrocarbure parent, indiquant que la solution de stock CEWAF était dominée par des gouttelettes de pétrole en phase libre, avec une proportion beaucoup plus petite d'hydrocarbures dissous. Malgré les changements dans la composition et la concentration des hydrocarbures dans les solutions WAF, BWWAF et CEWAF, leur toxicité aiguë était semblable lorsqu'elle était exprimée sous la forme de concentrations de naphtalène mesurées. En supposant que la plupart des naphtalènes sont dissous, cela laisse entendre que les poissons ont réagi à l'hydrocarbure dissous, plutôt que particulaire, et qu'une plus grande dispersion des gouttelettes de pétrole a accru l'exposition aux hydrocarbures dissous. Pour comprendre les interactions entre les méthodes de préparation de solutions et la toxicité mesurée, il est essentiel de mesurer les concentrations d'hydrocarbures dans les solutions d'essai.

Le système de mélange comprend l'équipement ou la méthode servant à préparer les solutions d'essai et de stock huile/eau dans les essais de toxicité inclus dans le présent examen. En tout, 226 méthodes de mélange pour produire des solutions ont été enregistrées dans les 144 publications analysées, dont 20 appareils uniques ou systèmes de mélange huile-eau (Figure 5). Près de la moitié des publications ont eu recours à plus d'un système de mélange, ce qui explique pourquoi le nombre de méthodes de mélange est supérieur à celui des publications. Les appareils ou méthodes de mélange les plus courants étaient la méthode d'agitation magnétique (**AM**) définie par le CROSERF (Aurand et Coelho 2005), la méthode modifiée du CROSERF (Singer *et al.* 2000) et celle d'Anderson *et al.* (1974). La taille du barreau d'agitation détermine la profondeur et la stabilité du tourbillon, ainsi que la mesure dans laquelle les hydrocarbures dissous et particulaires sont intégrés dans les solutions de stock. Bien que les lignes directrices du CROSERF (Aurand et Coelho 2005) recommandent un barreau d'agitation de 2 po (50,8 mm) pour 2 litres de solution et de 1 po (25,4 mm) pour 1 litre de solution, seuls Tsvetnenko et Evans (2002) ont défini systématiquement la taille optimale (37 mm) du barreau et la forme de leurs récipients expérimentaux (flacon conique de 1,0 litre) pour produire des solutions de stock uniformes. Quelques documents précisent la taille ou la forme des barreaux d'agitation utilisés pour préparer la solution de stock ou d'autres conditions de brassage.

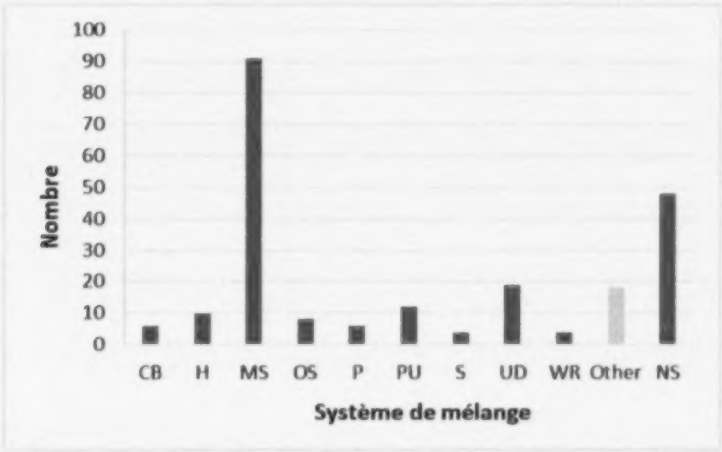

*Figure 5: Nombre d'essais de toxicité réalisés à l'aide d'un système de mélange donné pour préparer les solutions d'essai et de stock d'hydrocarbures dans l'eau. Certaines études ont utilisé plus d'un système de mélange dans une seule expérience (N=226). Mélangeur commercial (**MC**); mélange à la main (**M**); brassage magnétique (**BM**); agitateur orbital (**AO**); agitateur axial (**AA**); pompe (**P**); sonicateur (**S**); dilution par remontée d'eau (**DR**); recirculation de l'eau (**RE**); systèmes de mélange apparaissant trois fois ou moins dans les publications (**Autre**); système de mélange non spécifié de façon explicite dans la publication (**NS**). Un document a été omis puisqu'il ne mentionnait aucun mélange d'huile et d'eau.*

Le deuxième système de mélange le plus courant était la dilution par remontée d'eau (**DR**). Un flux continu d'eau remontant à travers des substrats mazoutés (p. ex., gravier) a créé des solutions d'essai pour les essais de toxicité en séparant les hydrocarbures de la phase échouée à une phase aqueuse mobile. Les systèmes les plus courants ensuite étaient les pompes (**P**) pour mélanger et faire circuler l'huile et à l'eau et le mélange à la main (**M**). De nombreuses publications (21,2 %) ont été classées comme ayant utilisé des systèmes non spécifiés (**NS**), car la préparation des solutions n'était adéquatement décrite. Par exemple, la préparation a été décrite simplement comme étant « brassée lentement » (Ernst & Neff 1977), « brassée » (da Cruz *et al.* 2012) et « mélangée » (Shuka *et al.* 2007). D'autres systèmes de mélange ont été utilisés : appareil de mesure de la toxicité à flux continu, tige de verre, agitateur manuel, « mélangeur », arbre à pale, cercle en plastique, mélangeur à peinture et plaque d'agitation. Ce manque de détails empêche de reproduire les expériences et de comparer les résultats entre les études.

La méthode utilisée pour produire les solutions d'essai reflétait généralement l'objectif de l'étude (Tableau 5 et figure 5). Par exemple, un brassage magnétique a été utilisé fréquemment pour créer des solutions WSF, WAF ou CEWAF en vue de simuler les déversements d'hydrocarbures épisodiques, tandis que la dilution par remontée était courante dans les essais visant à simuler la toxicité de hauts-fonds de frai contaminés pour les embryons. Les systèmes de mélange étaient également déterminés par le fait que l'on préparait une seule concentration de la solution d'essai (méthode du CROSERF) ou que l'on diluait une solution de stock dans des systèmes statiques ou semi-statiques ou dans un régime à flux continu ou à exposition constante. Le brassage magnétique a été le plus souvent utilisé dans les applications statiques ou semi-statiques, tandis que les dilutions par remontée, les hélices (agitateurs axiaux) et les pompes l'étaient plus fréquemment dans les systèmes à flux continu.

D'autres systèmes uniques ont été utilisés pour mélanger les hydrocarbures et l'eau : un réservoir de mélange divisé en quatre compartiments pour mélanger l'huile et l'eau, tout en empêchant les petites nappes de pétrole et les gouttelettes en suspension d'atteindre le

réservoir d'exposition adjacent (Danion *et al.* 2011); un système de pompage raccordé aux réservoirs de mélange et d'exposition recirculait l'eau entre les deux; un flux continu de la solution WSF de pétrole brut de Cook Inlet a été mis en place en faisant couler de l'eau à travers une couche d'huile constamment renouvelée sur le dessus d'une colonne d'eau alors que cette approche limitait la quantité de pétrole particulaire qui entrait dans la colonne d'eau (Moles et Rice 1983). Un flux continu de carburant diesel WSF a été généré en ajoutant l'huile à un flux d'eau avec une pompe péristaltique (Croce et Stagg 1997). Le contact de l'eau et du pétrole était amélioré par un réservoir de réception avec des chicanes dentelées, et une pompe submersible envoyait la solution WSF dans un séparateur pour en retirer les hydrocarbures particulaires avant qu'elle arrive dans les réservoirs d'exposition pour les essais de toxicité. Nordtug *et al.* (2011) ont pompé un mélange d'huile et d'eau de mer à travers des buses en ligne pour créer une dispersion continue de petites gouttelettes de pétrole favorisant la séparation huile-eau des hydrocarbures. La solution était filtrée pour enlever les gouttelettes de pétrole de la solution WSF et les empêcher de remonter à la surface et d'adhérer aux surfaces mouillées. Le système a produit des dispersions prévisibles et contrôlées des hydrocarbures dans l'eau et des solutions WSF. Ces systèmes à flux continu sont moins couramment utilisés que les systèmes statiques ou semi-statiques, probablement parce qu'ils sont plus complexes techniquement et plus coûteux. Néanmoins, ils sont plus susceptibles de produire des données comparables entre les essais, car la chimie des solutions change moins pendant les essais.

L'appareil de mélange et l'énergie qu'il transmet auront une influence sur la distribution par taille des gouttelettes d'hydrocarbures, leur adhésion à l'équipement ou aux surfaces, ainsi que sur la concentration des hydrocarbures dissous et particulaires dans les solutions d'essai. Les huiles ayant une viscosité et une composition différentes, les variations de la charge en hydrocarbures, ainsi que les variations de l'énergie de mélange auront une incidence sur la distribution par taille des gouttelettes et le ratio pétrole dispersé/pétrole dissous (Nordtug *et al.* 2011). Un agitateur manuel, une pompe centrifuge et un mélangeur commercial ont été utilisés pour mélanger l'huile et l'eau afin d'évaluer la distribution par taille des gouttelettes de pétrole dans des émulsions produites mécaniquement (Stokes et Harvey 1973). En se fondant sur la taille et la distribution des gouttelettes, les auteurs ont choisi le mélangeur commercial comme appareil standard pour préparer les solutions d'essai. Pour produire une solution WAF avec moins de 5 mg/l de gouttelettes de pétrole, les systèmes de filtration doivent être capables d'éliminer les gouttelettes de l'ordre de 2 à 3 microns.

Les publications qui ont fourni un schéma de leurs appareils ou système de mélange, en particulier s'ils sont nouveaux ou complexes, ont été utiles pour interpréter et reproduire les résultats. L'appareil ou système de mélange utilisé pour produire les solutions d'essai a été souvent choisi en fonction de son énergie de mélange perçue. Néanmoins, sans des méthodes pour mesurer l'énergie de mélange ou des relations quantitatives entre l'énergie de mélange et la taille des gouttelettes, il n'existe pas d'outils pour comparer l'efficacité des différents instruments ou systèmes de mélange. L'article de Gardiner *et al.* (2013) a été l'un des quelques documents qui ont comparé des méthodes à énergie différente, mais la différence était créée en faisant basculer mécaniquement régulièrement un flacon d'aspiration de 20 litres. Le basculement était comparé à des conditions de vagues légèrement énergétiques (état de la mer 2-3), mais aucune énergie de mélange quantitative n'a été déterminée. La seule façon d'évaluer l'efficacité des différents systèmes de mélange est de comparer les caractéristiques des solutions qui sont produites, y compris la distribution par taille des gouttelettes de pétrole, la composition et les concentrations des hydrocarbures et la toxicité (voir la section 4.3.3). Cependant, les mesures de la taille des gouttelettes et des concentrations d'hydrocarbures sont coûteuses et ne sont pas souvent indiquées avec les données sur les essais de toxicité.

Les caractéristiques physiques du pétrole mis à l'essai jouent également un rôle essentiel dans l'efficacité du mélange huile-eau. Comme il est indiqué à la section 4.1.1, les huiles très visqueuses se dispersent difficilement et produisent des gouttelettes de pétrole de grande taille et instables, ce qui entraîne une séparation lente des hydrocarbures dans l'eau (Martin *et al.* 2014). Leur toxicité inhérente peut être sous-estimée, car la plupart des constituants toxiques ne peuvent pas se séparer dans les solutions d'essai en des concentrations toxiques dans l'échelle temporelle de l'essai. Parce que l'altération du pétrole accroît sa viscosité, les comparaisons de la toxicité du pétrole altéré et non altéré peuvent être biaisées par une réduction de l'efficacité de la dispersion physique. Cela est particulièrement pertinent pour les essais effectués avec du bitume dilué, étant donné que la fraction restante après l'altération a une densité et une viscosité semblables à celles d'un mazout lourd (ENG 2011, tel que cité dans GC 2013), et que l'altération des stocks de bitume dilué peut se produire au cours d'un programme d'essais de toxicité.

Besoins prioritaires en matière de recherche

- Élaborer une méthode (ou un système) de routine pour déterminer l'énergie de mélange qu'un chercheur peut appliquer en pratique — y compris la sonication et le mélange à grande énergie.
- Réaliser une étude documentaire pour démontrer la gamme des énergies de mélange associées aux déversements dans des océans, sur des côtes, dans des lacs et dans des rivières où les courants et la turbulence sont différents.

Par conséquent, les méthodes normalisées de préparation des solutions de bitume dilué altéré pourraient comprendre l'application de dispersants chimiques, une énergie de mélange plus grande ou le mélange sélectif compartimenté pour surmonter la viscosité élevée. Pour les évaluations du risque, des avis sont nécessaires sur la toxicité du bitume dilué dans des conditions de déversement réel, qui pourraient être obtenus en répétant les essais avec des énergies de mélange plus faibles et en mesurant quantitativement les énergies de mélange dans des environnements réels et en laboratoire.

4.2.3 Eau de dilution pour la préparation des solutions de stock et d'essai

L'utilisation d'eau douce plutôt que d'eau de mer comme diluant aura une incidence sur le comportement des hydrocarbures dans la solution, en particulier la densité et la flottabilité des gouttelettes. Comme l'eau de mer est plus dense (1,024 g/cm^3) que l'eau douce (0,998 g/cm^3) à 20 °C, l'huile ajoutée à l'eau de mer sera moins susceptible de couler ou d'être entraînée dans la colonne d'eau que celle qui est ajoutée à l'eau douce. Pour le bitume dilué, l'effet de l'altération du pétrole (48 h à 15 °C) consistait à augmenter sa densité pour la rendre supérieure à celle de l'eau douce (suggérant qu'il coule), mais inférieure à celle de l'eau de mer (suggérant qu'il flotte) (gouvernement du Canada 2013). Malheureusement, il existe peu d'études sur le comportement des hydrocarbures dans l'eau douce (Dew *et al.* 2015), et d'autres recherches sont nécessaires.

La salinité a également une incidence sur l'accumulation des hydrocarbures et leur toxicité pour les organismes aquatiques, car les HAP sont moins solubles dans l'eau salée que dans l'eau douce. Ramachandran *et al.* (2006) ont découvert que l'absorption d'HAP par des juvéniles de choquemort et de truite arc-en-ciel exposés au pétrole diminue avec l'augmentation de la salinité lorsque celle-ci passe de 0 (eau douce) à 15 (eau saumâtre) et à 30 g/l (eau de mer). Par conséquent, les risques du pétrole déversé pour le poisson devraient être plus grands dans l'eau douce et l'eau saumâtre, et plus faibles à des taux de salinité élevés. L'absorption par les poissons d'HAP de produits pétroliers solubles peut également être sensible aux changements

de la perméabilité des branchies et de l'osmorégulation. Shukla *et al.* (2007) ont observé que le rôle de la salinité dans l'absorption d'HAP de pétrole brut par *Tilapia mossambica*, pour une plage de salinité allant de 0 à 33 g/l, et ont constaté que les concentrations d'hydrocarbures aromatiques dans l'eau à faible salinité (p. ex., les eaux côtières et les estuaires) sont plus élevées que dans les zones de salinité élevée (p. ex., en haute mer) et que le tilapia absorbe davantage d'HAP dans les eaux à faible salinité.

La salinité a également des répercussions sur l'efficacité et la toxicité des agents dispersants. Par exemple, l'efficacité du Corexit 9500 diminue lorsque la salinité augmente (Ramachandran *et al.* 2006), mais la toxicité des agents dispersants augmente avec la salinité (Wilson 1977). Dans une fourchette de valeurs de la salinité, le Corexit 9500 et les mélanges de pétrole et de Corexit 9500 sont demeurés toxiques pour les poissons estuariens pendant au moins quatre semaines à la salinité la plus faible mise à l'essai (4 g/l), ce qui laisse entendre une plus grande sensibilité des espèces mises à l'essai ou une réduction de la biodégradation des composants toxiques dans des environnements à faible salinité (Kuhl *et al.* 2013).

Le CROSERF donne des directives sur le type et la qualité de l'eau de dilution pour les essais de toxicité des diluants (Aurand et Coelho 2005, annexe 1). Selon ces protocoles, les essais devraient utiliser de l'eau de mer naturelle filtrée (0,45 µm) diluée avec de l'eau désionisée, au besoin, afin d'atteindre une salinité donnée. Si l'on ne dispose pas d'eau de mer naturelle, il est possible d'utiliser de l'eau de mer reconstituée, connue pour soutenir de manière constante et fiable un bon taux de survie et une bonne santé des organismes mis à l'essai. Les études comparant les diluants naturels et artificiels sont rares, mais Echols *et al.* (2016b) et Freeman (1953) recommandent d'utiliser de l'eau de dilution synthétique avec de l'eau distillée et des sels inorganiques, car cette formule peut être répétée entre les laboratoires. La spécification de l'eau de mer en tant qu'eau de dilution indique que les protocoles du CROSERF ont été conçus pour les espèces et les applications marines, en particulier dans les interventions en cas de déversements de grands volumes d'hydrocarbures en milieu marin.

Les essais effectués avec de l'eau douce ont parfois besoin de modifications pour donner des résultats optimaux. Par exemple, les déversements de pétrole en eau douce touchent souvent des lacs ou des rivières qui sont turbides en raison de niveaux élevés de la productivité primaire (cellules d'algues) ou des particules inorganiques en suspension résultant de l'érosion. Quelques publications ont signalé des solides en suspension dans l'eau de dilution, principalement parce que la plupart utilisent des fournitures de laboratoire d'eau filtrée. Le pétrole déversé peut adhérer aux argiles fines, formant des agrégats de pétrole et de minéraux et des boules de goudron flottantes (Lee *et al.* 2015). Bien qu'il soit peu probable que les agrégats de pétrole et de minéraux augmentent la toxicité, ils peuvent amener à la sous-estimer s'ils réduisent la biodisponibilité du pétrole mis à l'essai. Ils peuvent également accroître la durée d'exposition en augmentant la persistance de l'huile dans le système d'exposition. Les études sur les sédiments mazoutés ont été exclues de la portée de la présente analyse documentaire, mais il est clair que des essais de toxicité des sédiments sont nécessaires pour appuyer les ÉRÉ en eau douce. Les substances humiques se rencontrent également à des concentrations élevées dans certaines eaux douces, et leur effet sur la dispersion et le devenir du pétrole n'a pas été évalué.

Pour les 144 publications examinées, l'eau de dilution pour les solutions de stock pétrole/eau et l'eau utilisée dans les solutions d'essai ont été désignées comme étant de **l'eau douce** ou de **l'eau de mer** (Figure 6); les eaux n'ont pas été différenciées par leur salinité dans la catégorie de l'eau de mer. La salinité de l'eau saumâtre varie de 1-10 g/l (National Ground Water Association 2010) à 0-35 g/l (NOAA 2008). Par conséquent, les publications qui ont signalé une salinité supérieure à 1 g/l de l'eau de dilution pour les solutions d'essai ont été classées comme utilisant de l'eau de mer, y compris l'eau qui pourrait être considérée comme de l'eau saumâtre

ou estuarienne. Si les essais ont été réalisés avec de l'eau de mer et de l'eau douce, le document a été classé comme ayant utilisé **les deux**. Si le document ne précisait pas explicitement le type d'eau, il a été classé comme non spécifié (**NS**). Le diluant pour les solutions d'essai et le diluant pour les solutions de stock provenaient généralement de la même source et étaient désignés selon la même classification. Lorsque l'eau de dilution était mentionnée dans un document en tant que « milieu de croissance des embryons », l'entrée a été classée sous les solutions d'eau douce ou d'eau de mer selon l'habitat naturel des embryons visés par cette étude.

L'eau de dilution utilisée pour préparer les solutions de stock et d'essai pétrole/eau était principalement de l'eau de mer (Figure 6). Les autres publications ont indiqué avoir utilisé un diluant à l'eau douce, y compris des sources d'eau municipale et d'eau distillée, mais bon nombre n'ont pas précisé explicitement l'eau de dilution ou fourni suffisamment de renseignements pour qu'il soit possible de l'identifier. L'eau de dilution est davantage précisée pour les solutions de stock que pour les solutions d'essai, probablement parce que la préparation des solutions de stock est décrite en premier et que le lecteur doit supposer que le même type d'eau a été utilisé pour les solutions d'essai. Comme pour le « milieu de croissance des embryons », il a parfois été possible de déterminer l'eau de dilution des solutions d'essai à partir de la préférence de l'organisme mis à l'essai ou d'autres précisions données dans la description des méthodes. La salinité de l'eau utilisée pour préparer les solutions de stock a été précisée dans 33 publications et la salinité des solutions d'essai dans 49 articles. La salinité des eaux de dilution variait de 15 à 35 g/l, le plus souvent de 20 à 33 g/l, et la plus fréquemment signalée (21,2 %) était 30 g/l. La salinité des solutions d'essai de toxicité variait de 3 à 39 g/l, et se situait en général dans la plage de 20 à 35 g/l; la plus fréquemment signalée (14,3 %) était 30 g/l.

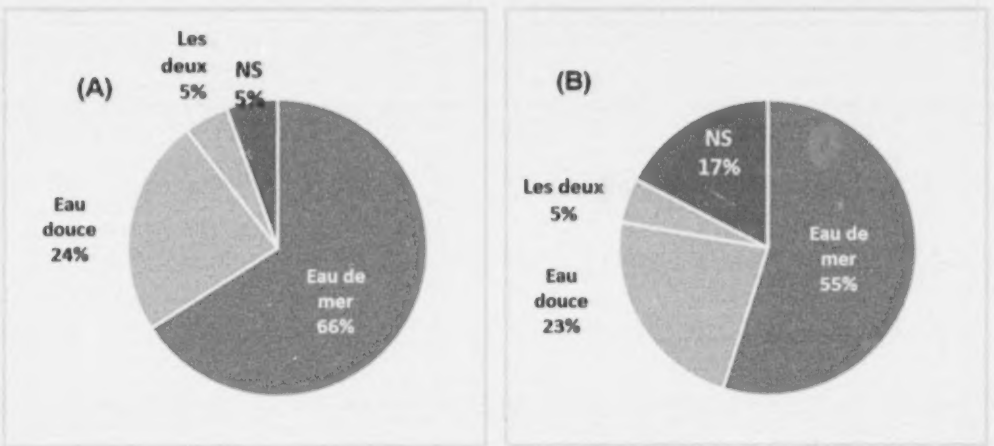

*Figure 6 : Pourcentage d'essais (N = 144) qui ont utilisé de l'eau douce, de l'eau de mer, les deux ou qui n'ont pas explicitement précisé (**NS**) le diluant utilisé pour préparer les mélanges de stock pétrole/eau des solutions WAF ou CEWAF (A) et les solutions d'essai (B).*

Les fluctuations de la salinité peuvent ajouter un élément de réalisme à une étude. Environ 5 % des publications ont indiqué avoir utilisé de l'eau douce et de l'eau de mer (**les deux**) pour préparer les solutions de stock et d'essai, souvent pour simuler des environnements côtiers ou estuariens. Par exemple, Carls et Thedinga (2010) ont augmenté la salinité deux fois par jour pendant des périodes d'une heure pour simuler les changements de salinité durant les cycles

de marée naturels. De même, Heintz *et al.* (1999) ont utilisé une combinaison d'eau douce et d'eau de mer pour simuler des environnements intertidaux. Les changements de salinité pourraient également être utilisés afin d'imiter le caractère saisonnier, par exemple, l'incidence de la fonte des glaces et de l'évaporation sur la salinité d'un milieu aquatique donné.

Besoin en matière de recherche

- Évaluer les effets sur le devenir et le comportement du pétrole des concentrations élevées de carbone organique dissous et particulaire, en particulier les acides humiques, dans l'eau douce.

4.2.4 Ratio pétrole/eau

Les volumes de mélange d'huile et d'eau sont souvent indiqués en tant que ratios pétrole/eau. La composition et la concentration de la solution d'essai sont fonction de la quantité et des proportions relatives des hydrocarbures dans le pétrole et des taux de séparation uniques de chaque composante du pétrole dans l'eau. Par conséquent, la méthode de la charge variable (ratio pétrole/eau variable) recommandée par le CROSERF permettra de générer des solutions d'essai avec différentes concentrations et proportions d'hydrocarbures. Par exemple, Shiu *et al.* (1990) ont mesuré la solubilité de 42 pétroles bruts à différentes températures (de 5 à 22 °C) et salinités (eau distillée double, 0 à 3 % de chlorure de sodium) avec des pétroles dans différents états d'altération et à des ratios pétrole/eau variables. La composition et la concentration de la solution WSF dépendaient des caractéristiques du pétrole d'origine et du ratio pétrole/eau. Les solutions WSF de pétrole brut préparées avec un ratio pétrole/eau de 1:5 contenaient des concentrations plus élevées d'hydrocarbures, dominées par les BTEX (80 %), que les solutions WSF préparées avec un ratio pétrole/eau de 1:100 000, qui ne contenaient que 15-50 % de BTEX. La composition des solutions WSF préparées à partir d'hydrocarbures de soute plus visqueux avec une fraction plus faible de composants volatils était plus uniforme sur une plage de ratios pétrole/eau. Pour les autres huiles, il y avait un seuil du ratio pétrole/eau au-dessus duquel aucun autre changement de la composition WSF n'a été mesuré. Le seuil était < 1:1 000 pour le brut de la baie Prudhoe (PBCO) et < 1:20 pour le mazout n° 2 (N2FO). Shiu *et al.* (1990) ont conclu que les solutions d'essai préparées avec différents ratios pétrole/eau ne peuvent pas être comparées, car la concentration et la composition de la phase aqueuse varient avec ce ratio. Lorsque l'énergie de mélange, la salinité et la température ont été maintenues constantes, les concentrations d'hydrocarbures dans la solution WSF de pétrole brut d'Arabie et d'huile de lubrification ont augmenté avec le ratio pétrole/eau, mais à un degré différent pour chaque pétrole et pas proportionnellement; Maher (1982; 1986) a signalé des résultats semblables.

Plusieurs méthodes ont également été décrites pour ajouter le pétrole dans l'eau, y compris l'ajout d'un poids de pétrole à de l'eau qui est déjà en mélange avec un vortex (Gardner *et al.* 2013) ou d'un volume de pétrole à l'aide d'une seringue Hamilton étanche aux gaz (Tjeerdema *et al.* 2007). Nous n'avons pas trouvé de publication dans laquelle on comparait la composition chimique ou la toxicité des solutions d'essai produites selon différentes méthodes d'ajout du pétrole.

Les ratios pétrole/eau ont souvent été indiqués dans chaque publication en tant que proportion de pétrole dans l'eau. Si le poids du pétrole par rapport au volume d'eau était spécifié, le ratio a été calculé. La méthode du CROSERF (Aurand et Coelho 2005) et une méthode modifiée couramment mentionnée (Singer *et al.* 2000) précisent l'ajout du pétrole dans l'eau selon certaines plages de valeurs, car elles recommandent une charge variable pour produire les

solutions d'essai; le CROSERF recommande de 0,01 à 25 g/l, tandis que Singer *et al.* (2000) ont utilisé de 0,01 à 10 g/l. Lorsque le poids du pétrole ajouté a été indiqué plutôt que son volume, le ratio pétrole/eau a été calculé en supposant une densité du pétrole de 1,0 g/ml, sauf indication contraire.

La fréquence à laquelle chaque ratio pétrole/eau a été indiqué a été représentée (Figure 7), mais si un ratio pétrole/eau a été spécifié trois fois ou moins, il a été classé dans la catégorie **Autre**. Si la quantité de pétrole ou d'eau n'était pas indiquée explicitement dans le texte, le ratio pétrole/eau était consigné comme non spécifié (**NS**). Si le pétrole n'était pas ajouté à de l'eau (p. ex., il était ajouté à un substrat), l'entrée était classée comme **S.O.** (sans objet) et n'était pas incluse dans l'analyse.

Dans la littérature examinée, les ratios pétrole/eau variaient de 1:106 667 à 1:1 (Figure 7). Sur les 219 entrées (certaines publications ont testé plusieurs ratios), 157 ratios pétrole/eau ont été indiqués, dont 44 uniques. Parmi les 157 ratios pétrole/eau déclarés, le plus fréquemment signalé était 1:9 (21,0 %); il avait été indiqué pour la première fois par Anderson *et al.* (1974), avant la publication des lignes directrices du CROSERF. Cinquante-huit entrées ont été classées comme **Autre** (26,5 %), ce qui indique une vaste gamme de méthodes qui brouillent les comparaisons de la toxicité du pétrole entre les études.

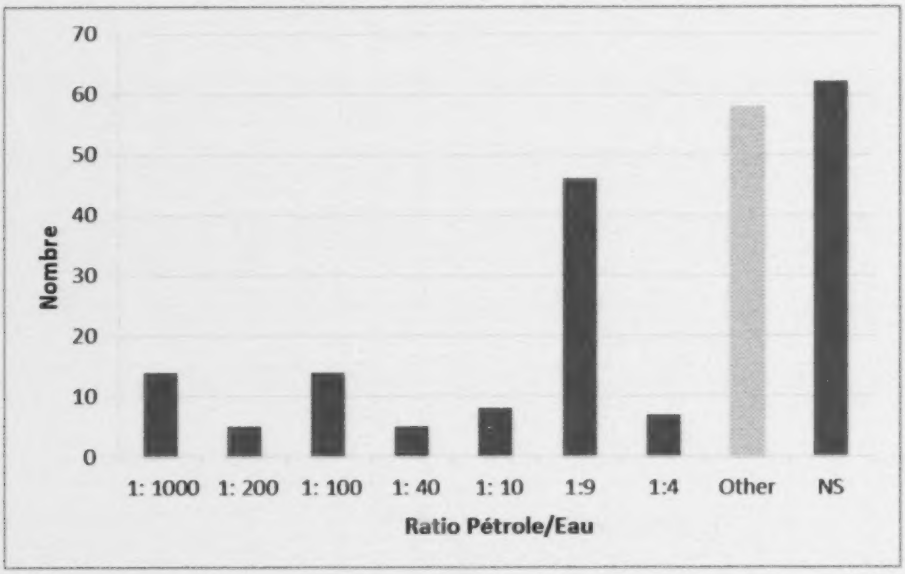

Figure 7 : Nombre de ratios pétrole/eau signalés dans les essais de toxicité du pétrole (N=219). Certaines études ont utilisé des ratios multiples dans la même étude. Les ratios indiqués trois fois ou moins ont été classés dans la catégorie ***Autre****. Lorsque le volume de pétrole ou d'eau n'était pas été indiqué, la publication a été classée dans la catégorie* ***NS*** *(non spécifié). 23 publications n'ont pas été incluses, car elles n'ajoutaient pas le pétrole dans l'eau.*

Compte tenu de l'influence du ratio pétrole/eau sur la composition chimique des solutions d'essai, il devrait être inclus dans tous les rapports d'essai.

4.2.5 Taille et forme du récipient de mélange

La taille du récipient de mélange devrait être déterminée par l'approche adoptée pour préparer les solutions d'essai, par le volume de solution requis pour l'essai de toxicité et par les mécanismes de mélange. Pour les essais effectués avec des embryons de poissons (souvent <

10 mg chacun), le volume de solution d'essai nécessaire par jour dans chaque traitement peut être inférieur à 100 ml, mais il faudrait 100 litres par jour pour les essais réalisés avec 10 juvéniles de 10 g chacun (voir la section 4.4.3). Lorsqu'une solution unique est créée pour chaque concentration d'une série d'essais (approche du CROSERF), un récipient de mélange équivalant à la taille de l'enceinte d'essai est nécessaire. Sinon, si les solutions sont préparées en diluant un seul stock de WAF ou CEWAF, un récipient beaucoup plus petit est nécessaire pour créer un stock concentré qui peut être plus pratique à créer et à dispenser. Le CROSERF a recommandé une fourchette de 1 à 20 litres pour réduire au minimum les effets de la géométrie et de la logistique sur la composition des solutions d'essai. Une version modifiée de la méthode CROSERF couramment citée par d'autres publications (p. ex., Singer *et al.* 2000), ne précisait pas la taille du récipient de mélange. Anderson *et al.* (1974) ont utilisé un récipient de mélange d'un volume d'environ 19 litres.

La géométrie du récipient de mélange pourrait avoir une incidence sur la séparation des hydrocarbures du pétrole dans l'eau. Le ratio superficie/volume des récipients de mélange détermine l'épaisseur du film d'huile pendant le mélange et la superficie pour la séparation huile-eau des hydrocarbures. Par conséquent, la cinétique de la séparation change avec l'épaisseur de la couche de pétrole et pas uniquement avec le ratio pétrole/eau (Tsvetnenko et Evans 2002; Ramachandran *et al.* 2004). Il existe peu d'évaluations systématiques des effets de l'épaisseur de la couche de pétrole sur les concentrations d'hydrocarbures dans l'eau.

Il est recommandé que la taille du récipient de mélange soit un juste milieu entre les éléments pratiques en laboratoire, une épaisseur de pétrole qui permet une séparation maximale des hydrocarbures entre le pétrole et l'eau, et le volume de solution d'essai nécessaire pour chaque essai de toxicité. La taille et la charge en biomasse des organismes mis à l'essai sont des facteurs importants pour déterminer le volume des solutions d'essai (section 4.4.3) et elles doivent être choisies avec soin lors de la planification d'un essai.

Chacune des publications qui ont indiqué le volume du récipient de mélange a reçu une désignation pour la taille du récipient sous la forme d'un volume en litres (N=201; figure 8). Les volumes ont été classés par fourchettes plutôt que par valeurs individuelles afin de limiter le nombre de catégories. La plupart des publications ont utilisé des récipients de mélange d'une contenance de 1 litre à moins de 100 litres, mais 38,3 % n'ont pas précisé (**NS**) le volume. Si l'huile et l'eau n'ont pas été mélangées dans un récipient (si le pétrole a été ajouté à un substrat plutôt que mélangé à l'eau), la méthode a été désignée comme étant « sans objet » (**S.O.**). Les volumes plus grands utilisés pour mélanger le pétrole et l'eau reflètent le protocole du CROSERF (Aurand et Coelho 2005), dans lequel chaque concentration huile-eau d'un essai de toxicité est mélangée de façon indépendante. Les volumes plus petits reflètent généralement la préparation d'une seule solution de stock avec des dilutions subséquentes.

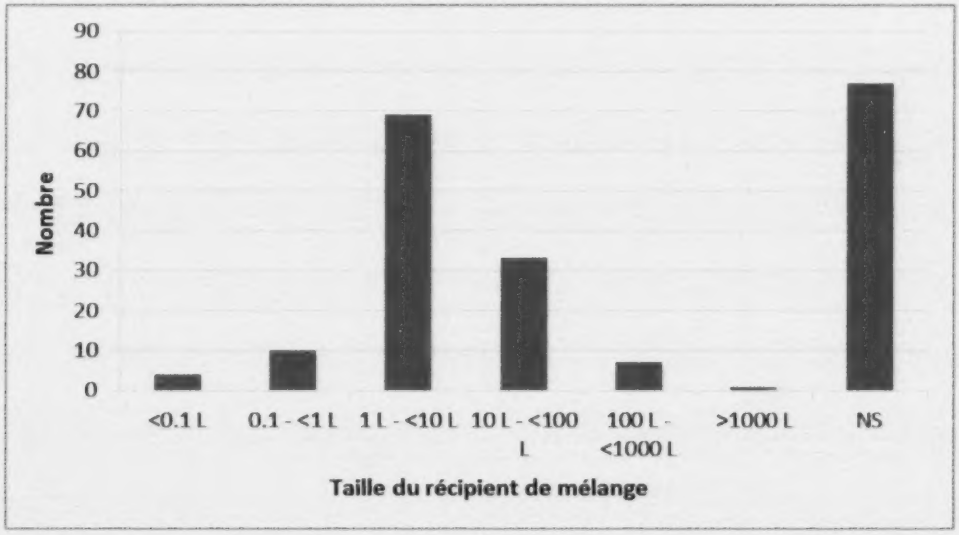

*Figure 8 : Nombre de tailles de récipient utilisées pour mélanger le pétrole et l'eau pour la préparation de solutions d'essai de toxicité, **NS**, lorsque la taille du récipient de mélange n'était pas précisée (N=201).*

4.2.6 Espace de tête dans le récipient de mélange

L'espace de tête est la partie du volume du récipient de mélange au-dessus de la phase aqueuse. Il est pertinent lors les récipients de mélange sont fermés durant la préparation des solutions WAF ou CEWAF; les récipients couverts d'une feuille d'étain ont été considérés comme des récipients ouverts. L'espace de tête et le ratio superficie-volume étaient parmi les caractéristiques les plus importantes d'un récipient de mélange (Singer *et al.* 2000). Un espace de tête fermé aura une incidence sur la composition de la solution d'essai huile-eau, car il retient les composés volatils susceptibles d'avoir un effet létal aigu et en limite la perte pendant le mélange huile-eau (Redman et Parkerton 2015). Par conséquent, l'influence d'un espace de tête fermé sur la rétention des éléments volatils est pertinente pour que les essais de létalité aiguë du pétrole brut frais ne soient pas touchés par la perte de ces substances volatiles pendant la préparation des solutions (CNR 2005). Singer *et al.* (2000) ont noté une meilleure reproductibilité des résultats des essais de toxicité aiguë dans les solutions d'essai lorsque l'espace de tête était de 20 % ou moins, probablement en raison des conditions d'analyse, différentes entre les laboratoires, qui ont une incidence sur la volatilité (Aurand et Coelho 2005) (p. ex., température). Pour la toxicité chronique, les poissons sont fort probablement exposés aux hydrocarbures altérés, de sorte que la perte des substances volatiles pendant le mélange fournirait une solution d'essai plus pertinente. La perte des substances volatiles pendant la préparation des solutions est un problème particulier pour les produits du bitume dilué non altéré (sections 2.1.1; 4.2.11), et devrait être réduite au minimum pour les essais de létalité aiguë plus précis, ainsi que pour éviter les changements de viscosité et de dispersibilité du bitume dilué pendant un brassage prolongé. En partant de ce principe, il faudrait appliquer la ligne directrice du CROSERF pour les essais de létalité aiguë.

Environ 10 % des 144 publications indiquaient la quantité d'espace de tête des récipients de mélange. Du fait du très petit nombre de publications qui précisaient cette valeur, elle a été exclue en tant que paramètre pour les statistiques descriptives dans cet examen. Les volumes d'espace de tête qui ont été signalés étaient les suivants : nul (Redman et Parkerton 2014; Hook *et al.* 2010), moins de 20 % (Echols *et al.* 2016a; Bidwell *et al.* 2003) et compris entre 20

et 25 % (Adams *et al.* 2014a; Adams *et al.* 2014b); dans ses lignes directrices, le CROSERF recommande un espace de tête de 20 à 25 % (Aurand et Coelho 2005; Barron et Ka'aihue 2003). Certains articles indiquaient l'espace de tête sous la forme d'un ratio eau/air; deux publications ont mentionné un ratio d'espace de tête de 4:1 (Faksness *et al.* 2008; Melbye *et al.* 2009). Le manque de documents précisant l'espace de tête du récipient de mélange suggère que la plupart des études ne le considérait pas comme important, mais il est évident qu'il s'agit d'une caractéristique de préparation des solutions qui doit être indiquée pour les essais de toxicité aiguë et chronique.

Pour le bitume dilué non altéré, il est recommandé que le récipient de mélange soit fermé avec un espace de tête minimum afin de retenir les substances volatiles pendant le mélange. Le mélange de produits altérés peut se faire dans des récipients ouverts ou fermés.

4.2.7 Dispersion chimique : Types de dispersants

Des agents de traitement des déversements sont disponibles pour retirer les films de pétrole à la surface de l'eau (agents dispersants), nettoyer le pétrole déposé sur les substrats du littoral, faire geler le pétrole pour qu'il soit plus facile à retirer du site d'un déversement et favoriser l'inflammation et la combustion du pétrole se trouvant à la surface pour éliminer les nappes de pétrole par combustion. Les protocoles du CROSERF ont été élaborés expressément pour vérifier la toxicité des agents dispersants chimiques et des mélanges dispersant-pétrole, et pratiquement toutes les publications sur la toxicité des agents de traitement des déversements examinées dans le cadre de ce rapport décrivent des essais avec des agents dispersants.

Les agents dispersants chimiques sont des mélanges de surfactants, de solvants et d'additifs qui réduisent la tension interfaciale entre les hydrocarbures et l'eau, facilitant la formation des gouttelettes de pétrole et les stabilisant pour limiter leur recoalescence sous la forme de films à la surface. L'effet global est une augmentation du taux de dilution de pétrole dans la colonne d'eau (Clark *et al.* 2005). Par exemple, la dispersion chimique du mazout lourd a augmenté 25 fois la concentration des hydrocarbures pétroliers totaux dans les solutions CEWAF comparativement aux solutions WAF (Martin *et al.* 2014). La quantité de pétrole dispersé dépend des caractéristiques du pétrole, des conditions de l'essai et du type de dispersant, qui a également une incidence sur la répartition par taille des gouttelettes de pétrole (Clark *et al.* 2005). Ces critères ont été utilisés pour évaluer et élaborer une liste acceptable d'agents dispersants pouvant être utilisés au Canada (Doe et Wells 1978).

Il existe une grande variété d'agents dispersants chimiques disponibles, et les agents dispersants étudiés dans le présent rapport représentent habituellement ceux qui sont facilement atteignables et dont l'utilisation est approuvée dans la région géographique de l'étude. Les agents dispersants les plus fréquemment utilisés sont le Corexit 9500 et le Corexit 9527, signalés dans plus de 50 % des études sur la dispersion chimique. Cette fréquence reflète les agents dispersants dont l'utilisation est recommandée par le CROSERF (Aurand et Coelho 2005; Barron et Ka'aihue 2003) et le fait que la plupart des études évaluées ont été réalisées en Amérique du Nord, où l'utilisation des agents dispersants Corexit est approuvée.

Le nom de l'agent dispersant chimique utilisé n'était pas précisé dans 4 % des publications, et tous les autres ont été utilisés moins de quatre fois, y compris :

- Berol TL 188
- Berol TL 198
- BP1100
- BP1100X
- Corexit 19— L-50
- Corexit 7664
- Corexit 8666
- Corexit 9517
- Crystal Simple Green
- Dasic Slickgone NS
- Dispersit SPC 1000

- Drew Chemical OSE 71
- Drew Chemical OSE 72
- Finasol OSR-2
- Finasol OSR-52
- Finasol SC
- HiClean II
- Hytron #3
- Inipol IP 90
- Innospech
- JD-2000
- Linco-6
- Max Clean 2
- Nafleet Oil Spill Dispersant
- NEOS AB3000
- Nokomis 3-AA
- Nokomis 3-F4
- Oilsperse 43
- Polyclens Industrial TS7
- Saf-Ron Gold
- Sea Brat 4
- Sea Green 80
- Shell dispersant LTX
- Shuangxiang No.1
- Sugee #2
- Symperonic OCD 20
- Total Fluides
- Weipu MD -55
- ZI-400

La toxicité des agents dispersants a été comparée dans des conditions variées, notamment la température, la salinité et la durée d'exposition. Le Corexit 9527 et le Corexit 9500 sont considérés comme étant faiblement à modérément toxiques; les CL50 et les CE 50 après 24-96 h varient de 1,6 à > 1 000 mg/l et de 0,7 à > 400 mg/l, respectivement (George-Ares et Clark 2000). Les méthodes de laboratoire utilisées afin d'évaluer la toxicité des agents dispersants ont fait l'objet de critiques en raison des durées d'exposition et des régimes de renouvellement statique qui ne sont pas conformes aux applications de dispersants au cours de déversements réels (George-Ares *et al.* 1999; George-Ares et Clark 2000). Toutefois, compte tenu de l'utilisation continue et prolongée du Corexit 9500 pour contrôler le déversement de pétrole de la plate-forme Deepwater Horizon, les expériences avec des expositions prolongées aux agents dispersants et au pétrole dispersé sont en fait tout à fait pertinentes. Les agents dispersants sont également importants expérimentalement en tant qu'outils pour éliminer les effets perturbateurs de la viscosité dans les comparaisons de la toxicité entre des pétroles aux propriétés très différentes (p. ex., Adams *et al.* 2014a).

La différence de toxicité entre le Corexit 9500 et le Corexit 9527 peut être attribuée aux variations de la composition du solvant. Le Corexit 9500 a été conçu expressément pour pouvoir être utilisé davantage dans diverses conditions et avec différents types de pétrole (George-Ares *et al.* 1999; George-Ares et Clark 2000) et il est plus efficace sur une plus grande fourchette de salinités que le Corexit 9527 (Blondina *et al.* 1999). L'efficacité de dispersion maximale pour un ensemble d'hydrocarbures avec des agents dispersants, y compris le Corexit 9526, Enersperse 700 et Citrikleen, a été enregistrée à une salinité de 40 g/l (la salinité de l'eau de mer est de 32 g/l) et elle diminuait lorsque la salinité était réduite à 0 g/l ou augmentait à 80 g/l (Fingas *et al.* 1991). L'efficacité diminuait pour des ratios dispersant/hydrocarbures supérieurs à des valeurs de 1:40 à 1:60. En général, l'efficacité de la dispersion augmente avec l'énergie de mélange, diminue avec l'altération du pétrole, et à chaque état d'altération, l'efficacité augmente avec la salinité (Chandrasekar *et al.* 2006; Clark *et al.* 2005).

Conformément aux tendances relevées dans Fingas *et al.* (1991) et Chandrasekar *et al.* (2006), Blondina *et al.* (1999) ont eu du mal à disperser les pétroles lourds et ont observé que les hydrocarbures encore présents après la dispersion chimique étaient constitués de masses filandreuses. La dispersion d'un éventail de mazouts lourds visqueux a été réduite pour les huiles dont la teneur en n-paraffines était plus élevée, probablement en raison de la cohésion des molécules de paraffine (Canevari *et al.* 2001). Les pétroles lourds plus visqueux résistent également à la dispersion à cause des taux de pénétration plus lents des agents dispersants

(Lessard et DeMarco 2000; Kaku *et al.* 2006). Étant donné que les formules des agents dispersants ont été fabriquées pour maximiser la dispersion en eau salée (Chandrasekar *et al.* 2006), leur efficacité est probablement réduite en eau douce (Lee *et al.* 2015). Aucune étude n'a précisé l'efficacité de la dispersion chimique du bitume dilué altéré ou non altéré. Bien que leur toxicité et leur efficacité varient grandement, le choix des dispersants dépend davantage de leur disponibilité et de leur pertinence pour les utilisations permises que de l'optimisation des méthodes d'essai de toxicité.

La dispersion chimique pour les tests normalisés peut être utile pour maximiser la séparation du pétrole dans l'eau sans modifier la toxicité du pétrole (comme cela a été observé avec les pétroles lourds visqueux). L'efficacité des dispersants variera selon l'état d'altération du bitume dilué et doit être évaluée avant les essais de toxicité. La seule étude publiée sur le bitume dilué dispersé chimiquement n'a pas évalué l'efficacité de la dispersion du pétrole CLB par le Corexit 9500 (Madison *et al.* 2015).

4.2.8 Dispersion chimique : Ratio dispersant/pétrole

Le ratio dispersant/pétrole est le rapport du volume de dispersant appliqué et du volume de pétrole dans le récipient de mélange. Il est important de choisir un ratio dispersant/pétrole approprié, car un surdosage peut entraîner un excédent de dispersant dans la colonne d'eau qui risque de présenter une toxicité aiguë et un sous-dosage peut réduire l'efficacité du dispersant. Les pétroles lourds ou les hydrocarbures déversés en eaux calmes nécessitent un ratio dispersant/pétrole plus élevé que les pétroles légers ou les déversements en eaux agitées, où l'énergie de mélange est grande (Chapman *et al.* 2007). Le ratio dispersant/pétrole dépend d'un large éventail de facteurs, notamment la dispersibilité naturelle et l'altération du pétrole, le temps de sédimentation, l'énergie de mélange et même le ratio pétrole/eau correspondant (Clayton *et al.* 1992).

Le débat se poursuit sur les conditions dans lesquelles les agents dispersants chimiques causent de la toxicité dans les essais de toxicité du pétrole dispersé. Couillard *et al.* (2005) ont remarqué que les agents dispersants accroissent l'activité du gène CYP1A chez les poissons, ce qui a entraîné une plus grande toxicité médiée par ce gène. Les expositions du médaka japonais au CEWAF de bitume dilué ont provoqué des réponses moléculaires plus grandes que celles au WAF de bitume dilué (Madison *et al.* 2015). La différence pourrait s'expliquer en partie par les concentrations plus élevées d'hydrocarbures pétroliers totaux dans les solutions CEWAF comparativement à des dilutions équivalentes dans les solutions WAF, mais certaines réponses moléculaires étaient propres au Corexit 9500, comme l'indiquent les dispersants témoins. Par conséquent, les agents dispersants des solutions d'essai peuvent contribuer à la toxicité des mélanges de pétrole dispersé (voir la section 4.2.9).

L'efficacité de la dispersion chimique est mesurée par la mesure dans laquelle les nappes de pétrole sont divisées en gouttelettes plus petites et entraînées dans la phase aqueuse. La modification du ratio dispersant/pétrole modifie la tension interfaciale du pétrole et la dispersion est la plus grande lorsque la tension interfaciale est réduite au maximum (Khelifa *et al.* 2007). Le ratio dispersant/pétrole couramment utilisé pour les essais de toxicité du pétrole n'est peut-être pas celui qui produit les plus petites gouttelettes ou la dispersion optimale/maximale dans les conditions de l'essai, et un ratio dispersant/pétrole plus élevé ne cause pas toujours une plus grande réduction de la tension interfaciale. Par exemple, la dispersion du pétrole ANSC avec du Corexit 9500, à un ratio dispersant/pétrole de 1:20, a produit des gouttelettes de pétrole plus petites après 90 minutes de brassage à forte énergie que la dispersion à un ratio dispersant/pétrole de 1:10. En revanche, un ratio dispersant/pétrole de 1:10 était plus efficace pour disperser des IFO que des ratios dispersant/pétrole de 1:25 et 1:50 (Clark *et al.* 2005). Les méthodes utilisées pour ajouter l'agent dispersant au pétrole dans le récipient de mélange ont

rarement été indiquées, mais elles jouent un rôle important dans l'efficacité du dispersant. Elles comprennent l'ajout du dispersant « conformément aux instructions du fabricant » (Adeyemo *et al.* 2015), l'ajout au cours du mélange (Agamy 2013), le mélange préalable du pétrole et du dispersant avant l'application (Oslvik *et al.* 2012), l'ajout du dispersant « goutte après goutte » dans l'huile (Yu *et al.* 2015), l'ajout du dispersant au centre du vortex d'une solution brassée de pétrole sur l'eau (Adams, données non publiées) ou la répartition du dispersant sur l'ensemble de la surface de la couche d'huile (B. Madison, Université Queen's, communication personnelle). Les comparaisons de la toxicité d'hydrocarbures chimiquement dispersés et aux caractéristiques physiques différentes peuvent être faussées si l'efficacité des dispersants est différente. *Il est donc extrêmement important de préciser les ratios dispersant/pétrole et les techniques d'application des dispersants avec les méthodes d'essai de toxicité.*

Parmi les 226 méthodes de mélange mentionnées, 66 utilisaient la dispersion chimique pour générer les solutions d'essai (voir la section 4.2.7). Chacune de ces 66 méthodes a été classée selon son ratio dispersant/pétrole; cinq ont testé plusieurs ratios dispersant/pétrole, ce qui donne un total de 74 entrées et de 68 ratios dispersant/pétrole indiqués. Lorsque les publications indiquaient uniquement les quantités utilisées, le ratio dispersant/pétrole a été calculé en supposant une densité de 1,0 lorsque le poids du dispersant était précisé. Six publications n'indiquaient pas le ratio dispersant/pétrole ou les quantités de dispersant utilisées et ont été classées comme **NS**. Les ratios dispersant/pétrole variaient de 1:500 000 à 1:1, et parmi les 74 entrées, 37,8 % ont utilisé un ratio dispersant/pétrole de 1:10, 17,6 % un ratio de 1:20 et 8,1 % un ratio de 1:30 (Figure 9). Une catégorie distincte (**Autre**) a été utilisée afin de recueillir les données pour les ratios mentionnés dans trois entrées ou moins : il s'agit des ratios dispersant/pétrole de 1:500 000; 1:1 200; 1:1 000; 1:100; 1:50; 1:40; 1:25; 1:9; 1:5; 1:3 et 1:1.

À ce jour, aucune publication ne fait état du ratio dispersant/pétrole et de l'énergie de mélange optimaux nécessaires pour générer des solutions dispersées chimiquement de bitume dilué pour les essais de toxicité. Si on utilise des agents dispersants pour réduire au minimum les effets de la viscosité sur la dispersion du bitume dilué, il faut optimiser le ratio dispersant/pétrole et l'énergie de mélange afin de produire l'efficacité maximale du dispersant. Si on applique des agents dispersants pour imiter l'utilisation de dispersants lors de déversements réels, l'énergie de mélange et le ratio dispersant/pétrole devraient être conformes à l'utilisation des dispersants observés sur le site du déversement. Le ratio maximal pour les sites de déversement est de 1:20 en fonction de la conformité de l'intervention aux taux d'application publiés sur les étiquettes des produits dispersants (ASTM STP 1282; cadre proposé 4.6). Pour les essais effectués avec le bitume dilué, il faut effectuer des recherches sur les compromis entre l'efficacité et la toxicité des agents dispersants, et sur la distribution par taille des gouttelettes produites à différentes étapes de l'altération. L'ajout du dispersant sur une plus grande superficie du pétrole flottant peut améliorer la dispersion du bitume dilué et des pétroles plus visqueux.

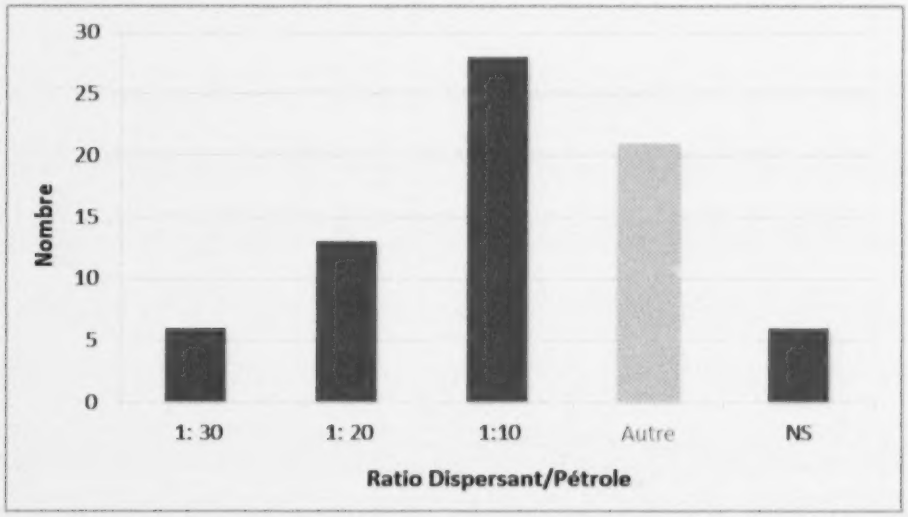

Figure 9 : Nombre de ratios dispersant/pétrole les plus fréquemment signalés. Si un ratio dispersant/pétrole donné a été utilisé trois fois ou moins entre toutes les publications, il a été classé dans la catégorie ***Autre****. Si le ratio dispersant/pétrole n'a pas été indiqué ou si les renseignements fournis dans la publication n'ont pas permis de le calculer, il a été classé comme non spécifié (****NS****).*

Besoins en recherche

- Déterminer les ratios dispersant-pétrole et les méthodes d'ajout du dispersant au pétrole qui sont optimaux pour réduire au minimum le dispersant « libre » dans les solutions d'essai et pour maximiser la quantité de pétrole dissous et particulaire dans la solution. Pour les évaluations des risques, il peut être nécessaire de tester différents ratios pour correspondre aux conditions propres au site ou aux règlements applicables.
- Évaluer différents témoins pour les essais de pétrole chimiquement dispersé afin de déterminer si oui ou non l'agent dispersant a une incidence sur le résultat des essais de toxicité, et s'il existe une toxicité interactive pétrole-dispersant.
- Évaluer l'efficacité de la dispersion chimique du bitume dilué altéré et non altéré selon la distribution par taille des gouttelettes produites, la composition chimique des solutions d'essai et la toxicité mesurée.

4.2.9 Dispersion chimique : Agents dispersants témoins

Le potentiel de toxicité synergétique de l'agent dispersant et du pétrole dispersé a été le sujet de nombreux débats et met en évidence l'importance des témoins dans les essais de toxicité du pétrole. Outre les témoins positifs pour détecter les effets et les témoins négatifs pour évaluer la santé des organismes mis à l'essai non exposés, il faut inclure des témoins pour tous les solvants ou méthodes utilisés. Cela est particulièrement important pour les essais de toxicité du pétrole dispersé chimiquement, afin de déterminer une éventuelle contribution de l'agent dispersant libre dans la solution d'essai. Les témoins peuvent comprendre la dispersion d'huiles minérales non toxiques (p. ex., Nujol) pour faire la distinction entre la toxicité du pétrole et celle du dispersant (Adams *et al.* 2014b). Parmi les études examinées comportant une dispersion chimique, la moitié comprenait un essai de toxicité témoin avec uniquement le dispersant, dont un petit pourcentage indiquait un témoin huile minérale — dispersant (4,8 %).

Sinon, on peut estimer la toxicité potentielle du dispersant dans le mélange en mesurant le dispersant non lié ou « libre » dans les solutions de stock CEWAF pour le comparer à un ensemble de données exposition-réponse sur le dispersant seul. Cette méthode suppose la toxicité additive du dispersant et des composantes du pétrole dans les traitements CEWAF. Il existe des méthodes d'analyse pour quantifier la quantité de dispersant dans les solutions d'essai de toxicité. Par exemple, on a mesuré des composantes du Corexit 9500 et du dioctylsulfosuccinate par spectrométrie de masse à haute résolution (SMHR) et détection des aérosols chargés, respectivement (Choyke et Ferguson, 2015). Aurand et Coelho (2005) ont décrit le protocole du CROSERF pour mesurer les dispersants par spectroscopie UV-VIS. On ignore cependant si ces méthodes permettent de différencier le « dispersant libre » du dispersant associé aux gouttelettes de pétrole dans les échantillons CEWAF.

De futures expériences de dispersion chimique devraient utiliser l'un de ces types de témoins pour déterminer les effets liés au dispersant ou sa possible synergie avec la toxicité du pétrole.

Besoins en recherche

- Évaluer les effets chroniques et sublétaux des agents dispersants chimiques sur les poissons, à la fois individuellement et en combinaison avec des hydrocarbures.
- Élaborer des méthodes pour caractériser l'agent dispersant « libre » dans les solutions d'essai et les agents dispersants associés aux particules de pétrole.

4.2.10 Conditions de mélange

Diverses conditions de mélange peuvent avoir une incidence sur les résultats de l'essai de toxicité et la dispersion du pétrole, notamment la qualité de l'eau (pH, dureté, salinité), la température (Girling 1989) et les conditions de luminosité. Lorsqu'on mélange le pétrole et l'eau, le pH de l'eau peut favoriser la formation d'émulsions visqueuses et stables, plus particulièrement à des pH neutres et basiques (Daaou & Bendedouch 2012). La dureté de l'eau, plus précisément des concentrations élevées de minéraux, peut également avoir une incidence sur le mélange d'eau et de pétrole, mais les eaux très salines favorisent le mélange d'eau et de pétrole comparativement à des salinités décroissantes (Austad *et al.* 2011). Dans l'ensemble, la qualité de l'eau (pH, dureté, teneur en matières organiques, salinité) a rarement été précisée dans les études examinées, et les statistiques sommaires n'ont pas été préparées pour cet examen. Il n'est pas possible de préciser des valeurs ou des fourchettes de valeurs « normalisées » des paramètres de la qualité de l'eau, car la pertinence des paramètres dépend de plusieurs facteurs, notamment le scénario d'intérêt, l'espèce à mettre à l'essai, l'eau disponible et possiblement des détails précis de la méthode d'essai de toxicité.

Les températures de mélange indiquées dans les études analysées sont très variées. La température a une incidence sur la solubilité du pétrole dans l'eau, l'efficacité du mélange et le taux de perte des composés volatils de faible poids moléculaire (Shiu *et al.* 1990; Maher 1982). Les essais réalisés avec des espèces de l'Arctique adaptent souvent la température de mélange à l'environnement de l'espèce ciblée (p. ex., Barron et Ka'aihue 2003; Gardiner *et al.* 2013). Les températures de mélange plus basses non seulement modifient le comportement du mélange, mais aussi prolongent les périodes d'équilibre en raison des vitesses de séparation plus lentes pétrole-eau. Sinon, le mélange effectué à des températures plus chaudes entraîne une plus grande perte des substances volatiles et les changements correspondants de la viscosité (Hemmingsen *et al.* 2005). Il y a ainsi un compromis entre réalisme (mélange à des températures adaptées à l'environnement) et normalisation (mélange à la température ambiante). Le mélange à la température ambiante produira des solutions de stock plus reproductibles qui peuvent être diluées dans les solutions d'essai à d'autres températures en

fonction de l'espèce mise à l'essai, mais les effets des variations de température pendant la dilution sur la séparation huile-eau sont mal caractérisés. Les solutions de stock mélangées à d'autres températures correspondant aux solutions d'essai permettront d'éviter les variations de température et d'imiter plus étroitement les conditions à un site de déversement donné, mais les résultats seront plus difficiles à comparer aux études effectuées à la température ambiante habituelle ou à d'autres températures. *Les études réalisées avec un mélange de solutions de stock de pétrole et d'eau à des températures plus chaudes ou plus froides devraient comprendre un témoin mélangé à la température ambiante pour indiquer si la température de mélange a une incidence sur la toxicité.*

Sur les 144 articles examinés et 150 entrées de température précisées, 118 entrées ont indiqué une température de mélange de 20-25 °C. Lorsqu'un document ne précisait pas la température de mélange, on a supposé qu'il s'agissait de la température ambiante (21 °C). Le nombre des études à cette température de mélange peut donc être surestimé. Huit études ont utilisé une température de mélange de 25-30 °C. Sur les 26 publications qui ont indiqué des températures de mélange inférieures à 20°C, les températures étaient comprises entre 0 °C (N= 1; Davison *et al.* 1992) et 18 °C (N = 5; Camus *et al.* 1998; Ramachandran *et al.* 2004; 2006; Shukla *et al.* 2007; McIntosh *et al.* 2010). Dix de ces 26 publications portaient sur des systèmes de substrats mazoutés où la température avait été fixée à la température optimale de l'espèce mise à l'essai.

Quel que soit le régime de température utilisé dans une étude, il est recommandé d'indiquer soigneusement les détails de la méthode, y compris les températures de toutes les solutions et les systèmes pour faire changer la température d'une étape à l'autre.

Les études de photodégradation et de photooxydation ont montré que la lumière peut avoir une incidence sur la composition et la toxicité du pétrole, mais habituellement au cours de l'essai de toxicité, après le mélange (voir la section 4.4.2). Toutefois, l'éclairage pendant la préparation des solutions WSF augmente la fraction du naphtalène (Østgaard et Jensen 1983) et leur préparation à la lumière du soleil a accru la dissolution du pétrole et produit des peroxydes (Ziolli et Jadim 2001). Selon le document d'orientation du CROSERF, le mélange devrait être effectué dans l'obscurité, mais seuls 26 des 144 documents examinés précise les conditions de luminosité pendant le mélange : 18 dans l'obscurité, 2 avec une lampe à DEL, 4 avec une photopériode de 6 heures de lumière suivie de 16 heures d'obscurité, et deux études ont procédé au mélange pendant 10 heures de lumière suivies de 14 heures d'obscurité. *Il est recommandé de mélanger les solutions dans l'obscurité ou sous une faible intensité lumineuse sans les longueurs d'onde dans l'ultraviolet.*

Besoins en recherche

- Déterminer la sensibilité des résultats aux variations des principaux paramètres de la qualité de l'eau.
- Examiner l'effet du mélange des solutions de stock et de leur dilution dans les solutions d'essai à différentes températures, notamment les effets sur la composition chimique et la toxicité.

4.2.11 Durée du mélange

La durée du mélange est le nombre d'heures pendant laquelle le pétrole et l'eau, ou le pétrole, l'eau et l'agent dispersant, sont mélangés. Elle détermine la quantité de pétrole qui se sépare dans la phase aqueuse. Divers facteurs régissent le temps de mélange et modifient la nature de la solution pétrole/stock concernée. Le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre varie selon le pétrole et les conditions de l'essai; de ce fait, il est possible de ne pas atteindre l'équilibre

fonctionnel dans un temps de mélange standard et de sous-estimer la toxicité. Faksness *et al.* (2008) ont constaté que le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre est plus long dans le cas des solutions WAF préparées avec des huiles riches en cire et les solutions WAF préparées à des températures de mélange plus basses (voir la section 4.2.10), probablement en raison de l'augmentation de la viscosité du pétrole et de sa solubilité réduite. Cela signifie qu'un mélange plus long est nécessaire pour transporter une quantité donnée d'huile dans la phase aqueuse, en raison de la vitesse de séparation plus basse huile-eau. En ce qui concerne les huiles de lubrification, le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre était de 24 heures, mais il dépend de l'huile et du ratio pétrole/eau (Singer *et al.* 2001a). Pour les 18 pétroles bruts mis à l'essai par Singer *et al.* (2001a), la WAF était semblable pendant 24 à 48 heures pour le ratio pétrole/eau donné, mais les auteurs ont recommandé que la durée de mélange ne dépasse pas 24 heures pour éviter l'action des bactéries.

La valeur de la durée de mélange a été indiquée pour chaque solution huile-eau produite dans chacun des 144 documents (Figure 10); certains documents ont utilisé plusieurs mélanges huile-eau ou plusieurs temps de mélange pour la même solution, ce qui donne un total de 181 entrées. Les temps de mélange de l'huile et de l'eau sont extrêmement variables, passant de moins de 1,0 à plus de 72 heures dans les publications examinées. La durée la plus fréquemment signalée était de 18 heures (21,4 %), suivie de 24 heures (17,6 %) et de 20 heures (12,1 %). Si la durée du mélange n'était pas indiquée de façon explicite, elle a été classée comme non spécifiée (**NS**).

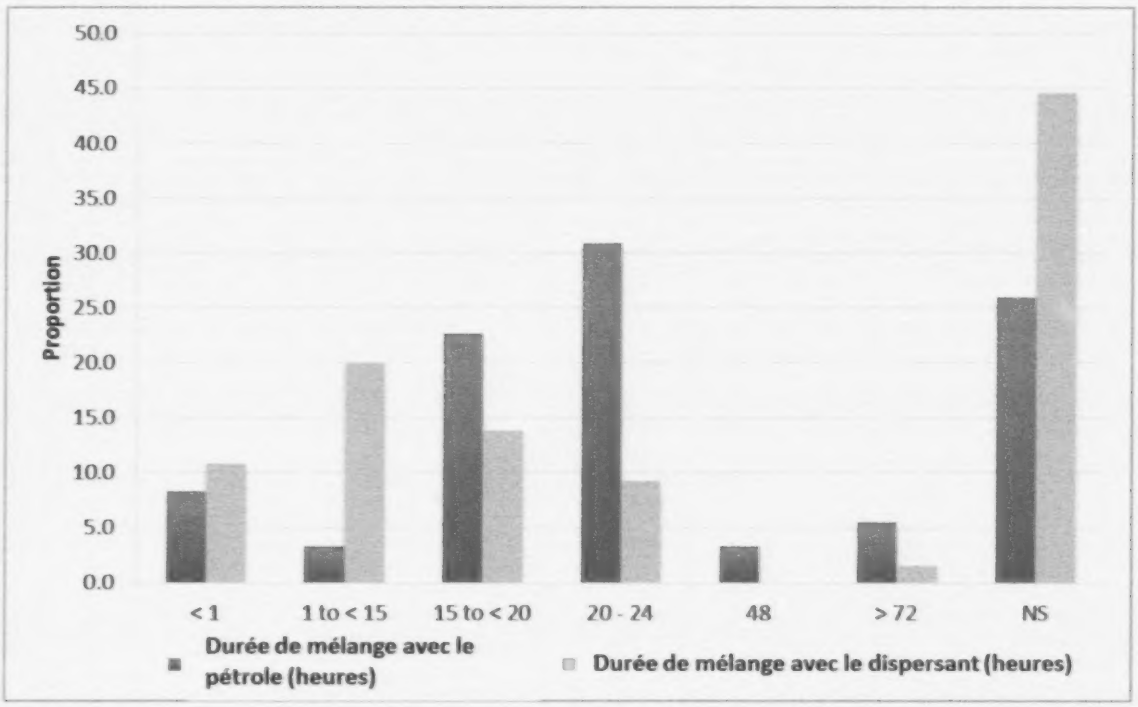

*Figure 10 : Proportion des durées de mélange (heures) de l'huile et de l'eau utilisées pour produire les solutions d'essai et durée de mélange du pétrole et du dispersant. Si le texte de la publication ne précisait pas de façon explicite la durée de mélange, elle a été classée comme non spécifiée (**NS**). Les durées de mélange indiquées sous la forme d'une plage de valeurs ont été omises dans ce graphique (N=1).*

La gamme des durées de mélange pour les solutions de pétrole, d'eau et de dispersant était

moins grande, de moins de 1 à 24 heures. La durée la plus fréquemment déclarée était > 1 heure, comme l'ont précisé 27,7 % de ces articles, bien que 44,6 % des documents pertinents n'aient pas indiqué la durée de mélange. Par comparaison avec les systèmes d'eau et de pétrole, il existe peu de documentation concernant la durée de mélange de pétrole, d'eau et de dispersant, autres que les lignes directrices du CROSERF. Les lignes directrices du CROSERF préconisent 18 heures de mélange, mais la durée doit être optimisée pour chaque huile en particulier (Singer *et al.* 2001a). Un autre facteur à prendre en considération est le cycle quotidien de préparation et de renouvellement des solutions d'essai pendant des périodes allant de plusieurs jours (toxicité aiguë) à quelques semaines (toxicité chronique). Les protocoles de mélange qui peuvent être réalisés en 24 heures permettent de réduire les ressources nécessaires pour exécuter un essai.

Le bitume dilué s'altère rapidement pendant la préparation des solutions d'essai en raison de l'exposition prolongée à l'air au cours du brassage. L'ampleur de l'altération dépend de la nature et du volume du diluant qu'on mélange au bitume, ainsi que de la température et de la durée du mélange requises pour préparer les solutions de stock WAF ou CEWAF. L'altération rapide pendant la manipulation et la préparation des solutions d'essai peut avoir une incidence sur la viscosité et la dispersibilité du bitume dilué, la quantité d'hydrocarbures dans la solution et la toxicité qui en découle. Il existe des interactions évidentes entre l'ampleur de l'altération, le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre pour la séparation de l'huile dans l'eau, la concentration des constituants toxiques dans l'eau et la toxicité mesurée. *Si l'étude vise à mesurer la toxicité du bitume dilué frais, les durées de brassage devraient être brèves, même si cela entraîne des concentrations plus faibles de pétrole dans l'eau. Les rapports sur la toxicité du bitume dilué doivent décrire les variations des propriétés du bitume dilué pendant la préparation des échantillons.*

Besoins en recherche

- Élaborer des procédures optimales pour la préparation des échantillons de bitume dilué.
- Évaluer la durée de mélange nécessaire pour que des bitumes dilués aux formules différentes et dans différents états d'altération atteignent l'équilibre fonctionnel entre les phases aqueuse et huileuse, particulièrement à une gamme de températures.

4.2.12 Durée de sédimentation

La durée de sédimentation est la durée (heures) pendant laquelle on laisse une solution pétrole-eau (ou agent dispersant) reposer sans la brasser après le mélange. Au fur et à mesure de la sédimentation de l'échantillon, les gouttelettes exemptes d'huile peuvent flotter à la surface, ce qui réduit la proportion d'hydrocarbures en phase libre dans les solutions d'essai, ainsi que les erreurs dans les analyses chimiques des concentrations d'hydrocarbures dissous causées par la contamination des échantillons par les gouttelettes.

Le nombre total de durées de sédimentation déclarées (N = 185; figure 11) ne correspond pas au nombre total de méthodes (N = 223), car il existe des méthodes pour lesquelles la durée de sédimentation n'est pas applicable. La durée de sédimentation variait de 0 à 72 heures. Les durées les plus fréquemment indiquées étaient une heure et six heures, qui ont été signalées dans 26,4 % et 11,9 % des entrées respectivement. On n'a pas précisé de durée de sédimentation (**NS**) dans 29,7 % des entrées, et 11 durées de sédimentation (6 %) comportaient une plage d'heures et sont classées dans la catégorie **Autre**. La plage indiquée le plus souvent était de trois à six heures, ce qui est conforme aux lignes directrices du CROSERF.

Après la sédimentation, on a souvent fait décanter la partie inférieure des solutions d'essai pour la séparer de la nappe de surface résiduelle avant de procéder aux essais de toxicité. Selon les lignes directrices du CROSERF, il faut laisser les solutions se déposer pendant trois à six heures après le brassage et ensuite les utiliser immédiatement. La plupart des variations de concentration ont eu lieu dans les trois premières heures de sédimentation, et on a souvent observé une diminution de la variation entre les mélanges dans un gradient après six heures (Lunel 1993). Comme c'est le cas pour le mélange, il a été suggéré que la durée de sédimentation ne dépasse pas 24 heures pour éviter l'action des bactéries (Singer *et al.* 2001a).

Pour les produits du bitume dilué, le temps de sédimentation optimal dépendra fortement de la génération des gouttelettes de pétrole dans l'eau et de leur distribution par taille. Compte tenu de la résistance à la dispersion des produits de bitume dilué altéré dans des conditions de faible énergie de mélange, il faudra sans doute un temps de sédimentation moins long que pour les pétroles bruts classiques; Madison *et al.* (2015) ont utilisé une durée de sédimentation d'une heure, tandis que Philibert *et al.* (2016) ont suivi la recommandation du CROSERF (quatre heures).

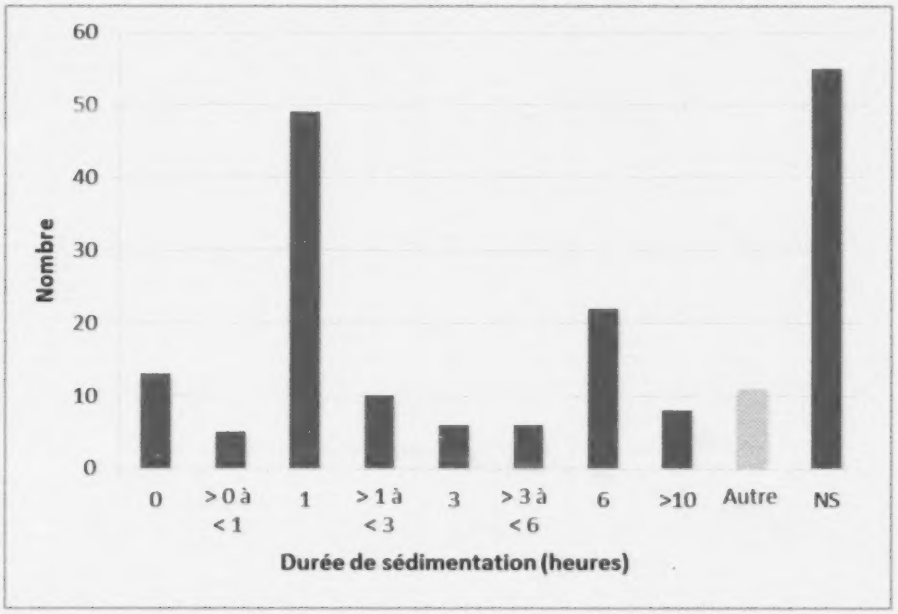

*Figure 11 : Nombre des durées de sédimentation (heures) du pétrole et de l'eau utilisées pour produire les solutions d'essai. Si la durée n'était pas indiquée de façon explicite, elle a été classée comme non spécifiée (**NS**).*

4.3 MÉTHODES DE CARACTÉRISATION DU PÉTROLE ET DES SOLUTIONS D'ESSAI

Les concentrations mesurées de pétrole dans les solutions d'essai montrent si les organismes mis à l'essai ont été exposés à des substances toxiques précises et à quelles concentrations (Harris *et al.* 2014). Pour les essais de toxicité du pétrole, il est essentiel de mesurer la composition et les concentrations réelles des hydrocarbures dans l'huile d'origine et dans les solutions d'essai. Étant donné que les hydrocarbures sont hydrophobes, il est également essentiel de mesurer les changements temporels de la concentration, sur une période de 24 heures pour les protocoles de renouvellement ou statiques, et sur toute la durée du test. En

ce qui concerne les études comparant des solutions WAF et CEWAF, les concentrations mesurées sont également nécessaires pour appuyer les discussions au sujet de l'utilisation des agents dispersants (Clark *et al.* 2001).

L'un des principaux objectifs du processus du CROSERF visait à améliorer la reproductibilité des solutions WAF et CEWAF. Les directives publiées du CROSERF comprenaient une liste des composants chimiques qui, idéalement, devraient être mesurés dans chaque solution de stock et solution d'essai diluée WAF ou CEWAF (Singer *et al.* 2000; Aurand et Coelho 2005) (Annexe 1). Les mesures de tous les composants chimiques figurant sur la liste du CROSERF sont généralement réparties en trois analyses (Singer *et al.* 2000) :

1. Les hydrocarbures pétroliers (HCP) totaux, par chromatographie en phase gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme (GC-FID). Cette méthode détecte habituellement les hydrocarbures en fonction du nombre d'atomes de carbone, et couvre la gamme C_{10} — C_{36}, bien que les résultats allant d'en-dessous de C_{10} jusqu'en-dessous ou au-dessus de C_{36} soient assez courants. Il est possible de reconstruire le paramètre HCP totaux en utilisant les résultats individuels de l'analyse des hydrocarbures par GC-MS, mais il faut valider cette approche avec GC-FID pour une huile donnée avant de pouvoir supposer que ces résultats des hydrocarbures pétroliers totaux sont équivalents.
2. Les composés volatils (souvent appelés carbones organiques volatils ou COV), par GC-FID ou GC-MS, lorsque la manipulation des échantillons est spécialement conçue pour détecter de manière fiable les composés volatils dans l'éventail C_6 — C_9. À l'heure actuelle, on préfère la GC-MS à la GC-FID. Afin de prendre tous les composés volatils en compte dans l'analyse, Aurand et Coelho (2005) ont recommandé d'inclure le cyclopentane, un composé du C_5 dont la volatilité est semblable à celle des hydrocarbures C_6 — C_9 (annexe 2, tableau 2a). Les composés volatils comprennent habituellement les composés BTEX mono-aromatiques (benzène, toluène, éthylbenzène, o,m,p-xylènes) qui dominent fréquemment le groupe des composés volatils. Certains articles ne donnent que les analyses de BTEX pour représenter l'ensemble du groupe des COV.
3. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), par GC-MS, qui sont parfois un sous-ensemble d'un groupe de composés « semi-volatils ». La somme des concentrations dans ce groupe est souvent appelée « HAP totaux ». Aurand et Coelho (2005) donnent la liste de 40 composés aromatiques (ou groupes de composés), qui peut être décrite comme commençant par la liste des 16 HAP prioritaires de l'US-EPA (tous non substitués), à laquelle on ajoute les biphényles, le benzo[e]pyrène et le périylène, puis le dibenzothiophène (un hétérocycle, mais inclus dans un souci de simplicité parmi les HAP dans la majorité des rapports) et les homologues alkylés C_1-C_4 du naphtalène, le fluorène, le phénanthrène, le pyrène, le chrysène et le dibenzothiophène. Beaucoup de rapports présentent un groupe plus petit ou plus grand que celui-ci, comme on le voit plus loin.

En général, la fraction hydrosoluble du pétrole comprend la fraction mono-aromatique (benzène, toluène, éthylbenzène et xylène [BTEX]), d'autres COV et des HAP à deux anneaux (naphtalènes). Cette fraction peut présenter une létalité aiguë, mais est la moins toxique de façon chronique. Il a été suggéré dans certaines études des pétroles lourds et très altérés que l'analyse des COV peut être omise, car ceux-ci ne seront pas présents dans le pétrole d'origine (Barron et Ka'aihue 2003). Les HAP intermédiaires, y compris les HAP alkyles à 3 ou 4 anneaux sont beaucoup moins hydrosolubles, mais le fractionnement chimique axé sur les effets (FCAE) a montré qu'ils sont les principales composantes du pétrole qui causent une toxicité chronique chez les embryons en raison de leur biodisponibilité et de leur persistance dans l'environnement (Carls *et al.* 1999; Hodson *et al.* 2007; Adams *et al.* 2014a). La corrélation de la toxicité et des HAP alkyles dans le pétrole et les solutions d'essai a été une force motrice

dans la mise au point de méthodes analytiques pour quantifier ces composantes dans l'huile, les mélanges d'hydrocarbures et d'eau et les solutions d'essai.

Pour le bitume dilué, l'altération pendant la manipulation, la préparation des solutions et tout au long de l'essai de toxicité peut être plus importante que pour les pétroles bruts, principalement en raison des composantes volatiles du diluant. Cela souligne l'importance de l'analyse chimique afin de suivre les changements des caractéristiques physiques et chimiques de ces produits au cours de l'expérience. Pour les produits du bitume dilué, la surveillance de la concentration, de la distribution et du ratio COV/HAP dans les échantillons d'eau peut permettre de faire le suivi de la chimie du bitume dilué pendant la manipulation et l'essai au fil du temps.

4.3.1 Concentrations nominales et mesurées

La plupart des documents examinés ont indiqué les concentrations mesurées des hydrocarbures dans les solutions d'essai (Figure 12). Seule une petite proportion (16 %) n'a signalé aucune analyse, et soit n'a donné aucune indication au sujet de la concentration, soit a précisé seulement les facteurs de dilution entre une solution de stock WAF ou CEWAF et diverses solutions d'essai. Dans quelques cas où on n'a pas recouru à une procédure de WAF ou de CEWAF pour disperser le pétrole, une concentration a été indiquée en fonction de la masse totale d'huile mélangée à l'eau, en supposant une dispersion complète. Les concentrations basées uniquement sur les facteurs de dilution ou sur une dispersion supposée complète sont appelées « taux de charge » (CONCAWE 1993), charges « nominales » ou concentrations « nominales » (Fucik *et al.* 1995). Rufli *et al.* (1998) ont recommandé de décrire les taux de charge nominaux pour comparer la toxicité en fonction de la quantité de pétrole qui parvient dans l'eau. Le principal défaut des charges nominales est l'hypothèse selon laquelle le protocole utilisé donnerait la même concentration d'huile dans la solution de stock WAF ou CEWAF que celle obtenue dans une autre étude indépendante dans laquelle les concentrations ont été mesurées (ou qui sera comparée). Comme nous l'avons mentionné précédemment, cette hypothèse est très problématique, même lorsqu'on utilise le même pétrole, en raison des nombreux facteurs qui ont une incidence sur la dispersion du pétrole dans la solution WAF ou CEWAF, y compris les facteurs d'altération qui ne peuvent pas être rigoureusement reproduits. Ces problèmes sont amplifiés lorsqu'on compare différentes huiles et que les propriétés physiques distinctes de chaque pétrole (p. ex. viscosité) auront une incidence sur les solutions de stock produites. En outre, les concentrations nominales ne tiennent pas compte des changements des concentrations d'hydrocarbures mesurées au fil du temps pendant les essais de toxicité. Les constituants du pétrole qui se séparent des gouttelettes de pétrole dans l'eau sont très hydrophobes et pourraient ne pas rester dans la solution s'ils peuvent s'adsorber aux particules, aux surfaces des récipients d'essai, etc. (Sprague 1969; Kiparissis *et al.* 2003).

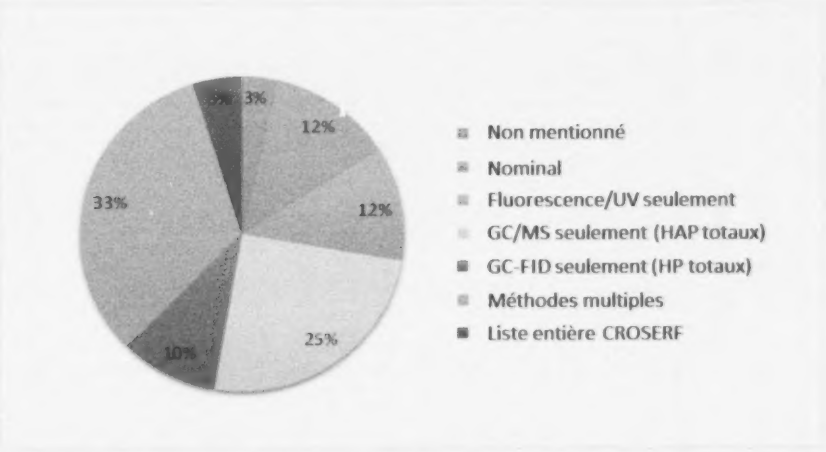

Figure 12 : Proportion des méthodes de caractérisation utilisées pour tester les solutions dans l'ensemble des documents examinés (N = 144). La « spectroscopie de fluorescence et la spectroscopie d'absorption » sont définies ci-après. On entend par « méthodes multiples » au moins une méthode fondée sur la GC et combinée à d'autres méthodes de GC ou de spectroscopie de fluorescence ou d'absorption. En tout, 22 publications ont indiqué des composés organiques volatils (COV), mais toujours combinés à une analyse des HAP totaux ou des HCP, ce qui fait qu'ils sont inclus dans les « méthodes multiples ». Dans la « liste complète du CROSERF », les analyses des HCP, des HAP totaux et des COV sont effectuées.

La caractérisation chimique des solutions de stock et d'essai pour fournir des concentrations mesurées peut permettre de surmonter les limites liées à l'utilisation des concentrations nominales (Aurand et Coehlo 2005; Forth *et al.* 2016) et de comparer les résultats des essais de toxicité entre les études utilisant différents pétroles et même différentes méthodes d'exposition. La caractérisation chimique détaillée peut aussi élargir l'utilisation des données publiées à d'autres applications, probablement imprévues, et permet de procéder à des comparaisons détaillées de la toxicité entre les différentes études (Redman et Parkerton 2015). La caractérisation du pétrole et des solutions d'essai peut servir à quantifier le changement de certaines composantes ciblées des solutions de pétrole au fil du temps.

4.3.2 Méthodes analytiques indiquées

La majorité des publications examinées utilisaient au moins une méthode pour mesurer les concentrations d'au moins un échantillon pendant les expériences (121 sur 144; 84 %; voir la figure 13). Seuls sept articles (5 %) ont indiqué des analyses chimiques couvrant la liste complète recommandée pour les trois groupes énumérés dans le CROSERF. Dans la pratique, les analyses signalées dans chaque étude ont varié en raison d'un certain nombre de facteurs. Certains choix tenaient aux objectifs de l'étude; par exemple, lorsque la toxicité des HAP était particulièrement intéressante pour une étude, il se peut que l'analyse des saturés (ou alcanes) ait été omise. D'autres étaient liés au pétrole étudié; ceux très altérés ou les pétroles lourds distillés sont connus pour être exempts de composés volatiles, y compris les BTEX, et les études de ces huiles peuvent avoir omis les analyses de COV. D'autres choix encore peuvent avoir été faits en fonction des ressources ou de considérations pratiques; une étude disposant d'un budget minimal pourrait décider de réaliser uniquement l'analyse GC-FID moins coûteuse et de délaisser l'analyse GC-MS, plus dispendieuse. Les méthodes choisies seront également fondées sur la conception de l'essai de toxicité. Bien qu'il ait été recommandé de retirer les COV des exigences en matière d'analyse en raison de leur volatilité et de leur faible persistance

(Barron et Ka'aihue 2003), *l'analyse des COV devrait être incluse pour permettre une comparaison entre les études et les huiles, en particulier pour les essais de létalité aiguë.*

La portée de l'analyse est également importante et varie entre les études. Il n'est pas toujours pratique ou possible d'analyser tous les échantillons préparés dans le cadre d'une étude selon chaque méthode disponible; le nombre d'échantillons qui peuvent être analysés au cours d'une période d'exposition sera limité. Il faut échantillonner tout le gradient de dilution et l'analyser au moins une fois pendant un essai afin d'établir la relation entre les dilutions et les concentrations mesurées. La majorité des publications (62 %) ont mesuré les concentrations d'hydrocarbures dans les solutions de stock (p. ex., WAF ou CEWAF) et au moins une dilution de la solution de stock ou d'essai, et ont précisé les concentrations nominales et mesurées. Lorsque les concentrations mesurées affichent une bonne concordance avec les valeurs attendues en fonction des facteurs de transfert et de dilution, il peut être possible d'estimer les concentrations dans d'autres échantillons en fonction de ces facteurs (Forth *et al.* 2016). Cela peut être particulièrement utile dans les études réalisées sur plusieurs dilutions lorsque les concentrations des échantillons les plus dilués sont inférieures à la limite de détection de l'analyse.

Les critères pour déterminer le nombre d'échantillons prélevés et la fréquence de l'échantillonnage dépendent de la conception de l'expérience (p. ex., régime d'exposition, durée) et devraient être planifiés avec soin afin de définir la nature dynamique des solutions d'essai. Par exemple, dans le cadre d'un régime d'exposition à renouvellement quotidien statique, les échantillons doivent être prélevés dans un délai de 24 heures pour décrire le régime d'exposition variable dans le temps en raison de l'absorption des hydrocarbures par les poissons et le récipient d'essai (Sprague 1969). Il faut aussi échantillonner quotidiennement au moins la concentration la plus élevée afin d'établir les changements à plus long terme des expositions et de fournir une mesure de l'écart.

Le manque d'uniformité dans l'utilisation des méthodes analytiques est également problématique en raison des variations entre les définitions des groupes composés d'une étude à l'autre et au fil du temps. Les pétroles sont des mélanges tellement complexes qu'il n'est pas possible d'identifier chaque composé présent dans chaque hydrocarbure et de l'assigner à un groupe désigné. Bejarano *et al.* (2013) ont souligné la nécessité de tenir compte des définitions des hydrocarbures pétroliers totaux C_7-C_{30}, C_8-C_{42}, et C_{10}-C_{36} dans un examen des autres études. Les articles sélectionnés pour cet examen comprennent également les définitions des hydrocarbures pétroliers totaux C_9-C_{44} (Gardiner *et al.* 2013) et C_9-C_{32} (Hemmer *et al.* 2011).

Ce point a été encore compliqué par des améliorations récentes de la capacité et de l'accessibilité de l'analyse GC-MS, ce qui a donné lieu à une liste constamment changeante des analytes à prendre en considération. L'analyse des HAP et des composés aromatiques en général est abordée dans la prochaine section. Il y a maintenant une liste croissante d'alcanes (principalement des alcanes à chaîne droite ou « n-alcanes ») qui peuvent être identifiés et quantifiés par des mesures normalisées GC-MS. Certaines études les utilisent en partie pour jouer le rôle que l'analyse standard des hydrocarbures pétroliers totaux aurait joué sinon, ce qui est acceptable à condition qu'une « somme des n-alcanes » soit clairement énoncée et ne soit pas directement comparée à un nombre d'hydrocarbures pétroliers totaux, à moins qu'elle ne soit validée comme équivalant à un résultat des hydrocarbures pétroliers totaux.

D'autres mesures du pétrole ou des groupes de composés qui n'utilisent pas la chromatographie gagnent en popularité. Les plus courantes sont la spectrométrie par fluorescence et d'absorption (appelées fluorescence et UV, respectivement); la spectrométrie infrarouge a également été mentionnée. Ces méthodes profitent des propriétés optiques des constituants aromatiques du pétrole, qui fournissent un moyen de détecter les hydrocarbures

dans de nombreuses solutions ou extraits à base d'eau. Elles sont rapides et peu coûteuses par rapport aux méthodes par GC, et pourraient présenter des limites de détection comparables ou meilleures. Le principal inconvénient des spectrométries de fluorescence et d'absorption est qu'elles ne sont pas propres à un ou plusieurs composés du groupe plus vaste des composés aromatiques, et qu'il n'est pas possible de comparer le signal de fluorescence ou d'UV d'une solution à un résultat provenant d'une autre solution à moins d'avoir d'autres renseignements sur la composition des solutions. Si un signal de fluorescence ou d'UV est soigneusement corrélé avec les composantes d'une série d'échantillons, habituellement au moyen d'une analyse GC-MS d'un ensemble d'échantillons précis, on peut utiliser la fluorescence ou la spectrométrie UV pour analyser les échantillons connexes. Par exemple, en ce qui concerne les échantillons répétés, pour une série de dilutions ou au cours d'une période d'exposition, on peut faire le suivi des changements des concentrations des composantes détectées en partant de l'hypothèse selon laquelle la composition relative est raisonnablement conservée. La spectrométrie de fluorescence a été utilisée pour mesurer la quantité d'huile dans l'eau en fonction des courbes normalisées reliant la fluorescence à des dilutions connues du pétrole entier (p. ex., Wu *et al.* 2012; Martin *et al.* 2014; Madison *et al.* 2015). Cette technique a également servi à mesurer les dispersions du bitume dilué et Madison *et al.* (2015) ont mis en corrélation les mesures de la fluorescence des solutions d'essai avec les mesures des solutions d'essai obtenues par GC-MS. Dans cet examen, 17 études ont uniquement utilisé la fluorescence ou la spectrométrie UV pour déterminer les concentrations des solutions d'essai, ce qui est mieux que les concentrations nominales, mais les utilisations en sont limitées. Seize autres études ont combiné la fluorescence ou la spectrométrie UV à une méthode fondée sur la GC, ce qui donne des renseignements supplémentaires tout en réduisant les coûts totaux et le temps de l'analyse.

Les analyses retenues pour l'évaluation du bitume dilué et des solutions de bitume dilué dans l'eau doivent être conformes aux méthodes utilisées pour les autres huiles. Selon la conception de l'expérience, l'accent peut être mis sur différentes méthodes (p. ex., davantage de travaux d'échantillonnage pour l'analyse des COV dans les tests de toxicité aiguë du bitume dilué non altéré ou pour la GC-MS dans les essais de toxicité chronique du bitume dilué altéré). Une lacune observée dans l'analyse des solutions de bitume dilué dans les ouvrages publiés est le manque de mesure détaillée des solutions d'essai à la fin des expériences.

Besoin prioritaire en matière de recherche

- Élaborer des méthodes d'analyse rapides et peu coûteuses afin de caractériser chimiquement le pétrole et les solutions d'essai (y compris les techniques de distillation à haute température).

4.3.3 Échantillons multiphasiques

Les méthodes d'analyse décrites dans le CROSERF et utilisées dans ces études ne permettent pas de faire la distinction entre les phases particulaire et dissoute dans les solutions d'essai, principalement parce que les échantillons d'eau sont extraits avec des solvants pour l'analyse. La mesure des solutions d'essai à plusieurs phases ne comprend pas habituellement de protocoles pour séparer les portions dissoute et particulaire des échantillons d'eau, ce qui nécessite un examen attentif des concentrations indiquées pour éviter de fausser l'interprétation des résultats des essais de toxicité (Redman *et al.* 2012). La toxicité des hydrocarbures dissous sera sous-estimée si des gouttelettes gonflent les concentrations mesurées de l'huile en milieu aqueux. La contribution des gouttelettes dans les solutions d'essai a été estimée sur la base des comparaisons des concentrations aqueuses prédites (calculées à partir de la composition du pétrole et de la solubilité des différentes composantes) pour les solutions d'essai mesurées

(Redman *et al.* 2012), et des techniques d'extraction en phase solide ont été proposées comme moyen de réellement mesurer la phase dissoute (Redman *et al.* 2014). La caractérisation des hydrocarbures particulaires dans les solutions d'essai est également liée à la stabilité et à la durée de l'exposition. L'exposition peut être plus longue que la durée prévue en raison de la présence de pétrole particulaire. Par exemple, lors d'une exposition intermittente ou à effets retardés des embryons de poisson, la durée d'exposition aux hydrocarbures sera prolongée ou améliorée si les gouttelettes de pétrole adhèrent au chorion (Sørhus *et al.* 2015) et constituent une source d'exposition.

La présence de gouttelettes peut être démontrée chimiquement en mesurant les constituants du pétrole peu hydrosolubles et très persistants, comme l'hopane, qui est détectable dans le pétrole, mais pas en tant qu'hydrocarbure dissous dans l'eau. Sa présence dans une solution est une indication claire de gouttelettes de pétrole. Parallèlement, une analyse chimique comparant la solution WSF au pétrole d'origine a permis de cerner clairement les différences dans la composition chimique, confirmant la présence de composantes à la dissolution différente dans l'échantillon d'eau (Bennett *et al.* 1990; Forth *et al.* 2016). Maher (1982) a utilisé la filtration avec fibre de verre pour déterminer la contribution des particules de pétrole plus grandes que les pores du filtre dans la solution WSF, mais la filtration n'est pas recommandée en raison de la perte ou de la modification de fractions dissoutes pendant la manipulation (Girling *et al.* 1994; Singer *et al.* 2001a). Plus précisément, le pétrole accumulé dans les filtres peut agir comme source d'hydrocarbures dans l'eau qui traverse le filtre.

La caractérisation des tailles des gouttelettes d'hydrocarbures dans les solutions d'essai au fil du temps permettra de mieux comprendre la variabilité entre les solutions d'essai due aux méthodes de préparation, aux types de produits pétroliers et aux états d'altération.

Besoins en recherche

- Évaluer les interactions entre le pétrole dissous et particulaire (dispersé physiquement et chimiquement) et les matières organiques particulaires, et leurs effets sur la toxicité mesurée du pétrole.
- Élaborer des méthodes peu coûteuses et pratiques pour mesurer la concentration et la distribution par taille des gouttelettes d'hydrocarbures dans les solutions d'essai pour distinguer le pétrole dissous du pétrole particulaire.
- Optimiser l'application des échantillonneurs passifs pour caractériser les concentrations d'hydrocarbures dissous dans les solutions d'essai.

4.3.4 Nombre d'analytes mesurés par GC-MS

Au fur et à mesure que la gamme des composés individuels du groupe des HAP qui peuvent être détectés par analyse GC-MS s'agrandit, la signification des paramètres comme les HAP totaux devient de plus en plus problématique. Le terme « HAP totaux » crée un biais potentiel dans la comparaison des concentrations mesurées dans l'huile et dans les solutions d'essai si le nombre d'analytes et leurs limites de détection varient d'une étude à l'autre. Les récents progrès réalisés dans les méthodes GC-MS à la suite de l'explosion du puits de la plate-forme Deepwater Horizon ont permis d'élargir la liste des analytes des HAP à plus de 50 composés ou groupes de composés (c.-à-d. qu'on fait la somme de tous les isomères HAPa ayant un nombre d'atomes de carbone précis pour donner un résultat unique, p. ex. C_3-phénanthrènes). Les principaux ajouts à la liste originale du CROSERF sont les benzothiophènes, les naphthobenzothiophènes et leurs homologues alkylés. Un acronyme distinct, « TPAH50 » (en anglais) a été créé pour distinguer ces mesures des HAP totaux (Forth *et al.* 2016; Alloy *et al.*

2016). Il est maintenant pratique courante d'indiquer la concentration des HAP totaux comme la somme de 50 ou plus analytes d'HAP, bien que l'utilisation de l'acronyme TPAH50 ne soit pas normalisée (p. ex., de récentes études sur le bitume dilué; Madison *et al.* 2015; Philibert *et al.* 2016). Pour que l'on puisse utiliser une mesure commune des concentrations d'hydrocarbures en vue de comparer la toxicité entre les études passées et futures, il faut que les publications donnent la liste complète des analytes.

Sur les 81 articles qui ont mesuré les HAP totaux, le nombre d'analytes le plus souvent mesuré était de 30 à 39, à 21 % (Figure 13). Étant donné que la liste du CROSERF compte 40 HAP, le nombre d'analyses dans les plages 40-49 et 50-59 (19 % et 14 %, respectivement) est encourageant. Toutes les analyses mentionnant 50 ou plus composés d'HAP totaux (24 articles) ont été publiées après 2007, ce qui reflète les récentes améliorations apportées à la méthode G-SM, bien que 22 autres articles publiés après 2007 aient indiqué moins de 40 analytes d'HAP totaux.

Besoin en matière de recherche

- Élaborer des objectifs de qualité des données pour évaluer la fiabilité des analyses chimiques des hydrocarbures et des solutions d'essai et pour comparer les résultats et le rendement entre plusieurs laboratoires.

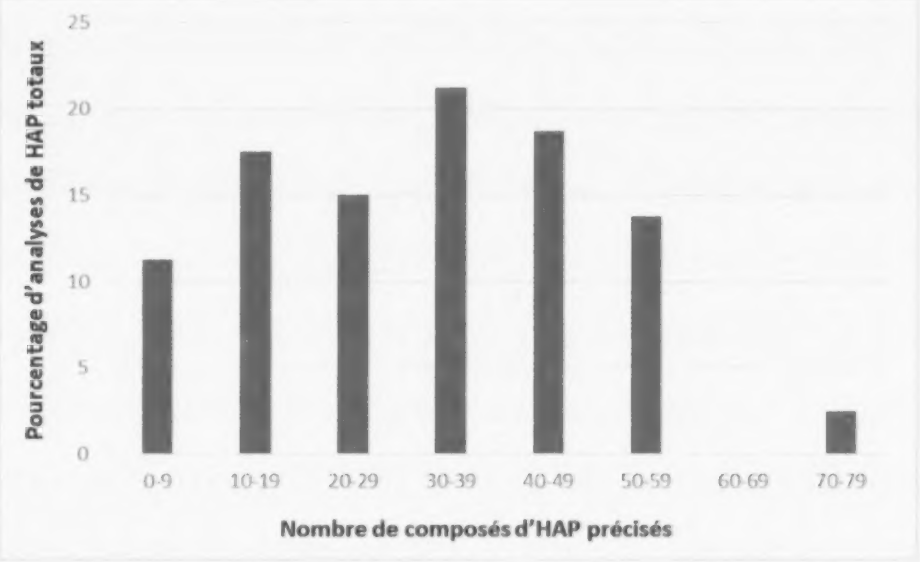

Figure 13 : Proportion d'analyses en fonction du nombre de composés d'HAP précisés. La liste du CROSERF comporte 40 composés d'HAP totaux.

4.4 RÉGIME D'EXPOSITION ET RÉSULTATS

4.4.1 Espèce, stade biologique et durée d'exposition de l'organisme d'essai

Le CROSERF a recommandé d'utiliser des espèces des eaux tempérées. L'exploration et l'exploitation récentes du pétrole dans l'Arctique ont permis d'élargir l'éventail des espèces d'essai et des conditions d'essai pertinentes. Par exemple, Barron et Ka'aihue (2003) ont recommandé d'utiliser des larves de hareng du Pacifique et Gardiner *et al.* (2013) ont évalué la toxicité du pétrole ANSC pour les copépodes (*Calanus glacialis*), les juvéniles de morue

arctique (*Borreogadus saida*) et les larves de chabot de profondeur (*Myoxocephalus* sp.) dans des conditions typiques des eaux libres des mers de Beaufort et des Tchouktches (p. ex., température de 0 à 5 °C, salinité de 20 à 35 ppm). Néanmoins, les espèces sélectionnées pour les essais de toxicité standards seront probablement celles qui sont disponibles localement ou précisées dans les lignes directrices sur les essais (p. ex., la truite arc-en-ciel, Environnement Canada 1998).

Au total, 74 espèces de poissons ont été représentées dans le cadre de l'examen, dont 24 qui figurent sur la liste de Pêches et Océans Canada en tant qu'espèces aquatiques vivant dans les eaux canadiennes. Dans la liste, les espèces représentées étaient regroupées dans les catégories « espèce marine » ou « espèce d'eau douce » et « espèce vivant dans des climats froids » ou « espèce vivant dans des climats tempérés » à l'annexe 3, et les espèces présentes dans les eaux canadiennes sont soulignées. Les espèces mises à l'essai utilisées dans 10 études ou plus sont le hareng du Pacifique (10), le saumon rose (11), la truite arc-en-ciel (11) et la capucette *Menidia beryllina* (17).

Environ 15 % des études portaient sur plus d'une espèce. De ce nombre, plusieurs ont utilisé diverses méthodes avec plusieurs huiles (p. ex., Swedmark *et al.* 1973; Anderson *et al.* 1974; Hedtke & Puglisi 1982; Woodward *et al.* 1987; Fucik *et al.* 1995; Clark *et al.* 2001; Lee *et al.* 2011; Adams *et al.* 2014b). Beaucoup ont comparé la toxicité pour les poissons à la toxicité pour d'autres organismes aquatiques (p. ex., crustacés, invertébrés benthiques), mais la portée de cet examen s'est limitée aux poissons.

La durée de l'exposition est la durée (jours) pendant laquelle les organismes ont été exposés au pétrole. Les durées d'exposition ont été classées pour chaque test examiné, ce qui a donné un total de 199 entrées (Figure 14). Si la durée n'était pas indiquée de façon explicite, elle a été classée comme non spécifiée (**NS**). Les durées d'exposition ont également été classées comme des essais de létalité **aiguë** (≤ 4 jours; essais généralement réalisés avec des juvéniles ou des stades embryonnaires), **chronique** (> 4 jours; essais principalement réalisés avec des embryons ou des larves) ou **les deux**, si une étude portait sur les expositions aiguës et chroniques (Figure 15). Les effets retardés qui ont été exprimés au-delà de la période de l'exposition au pétrole n'ont pas été codés, seule la durée de l'exposition réelle au pétrole l'a été.

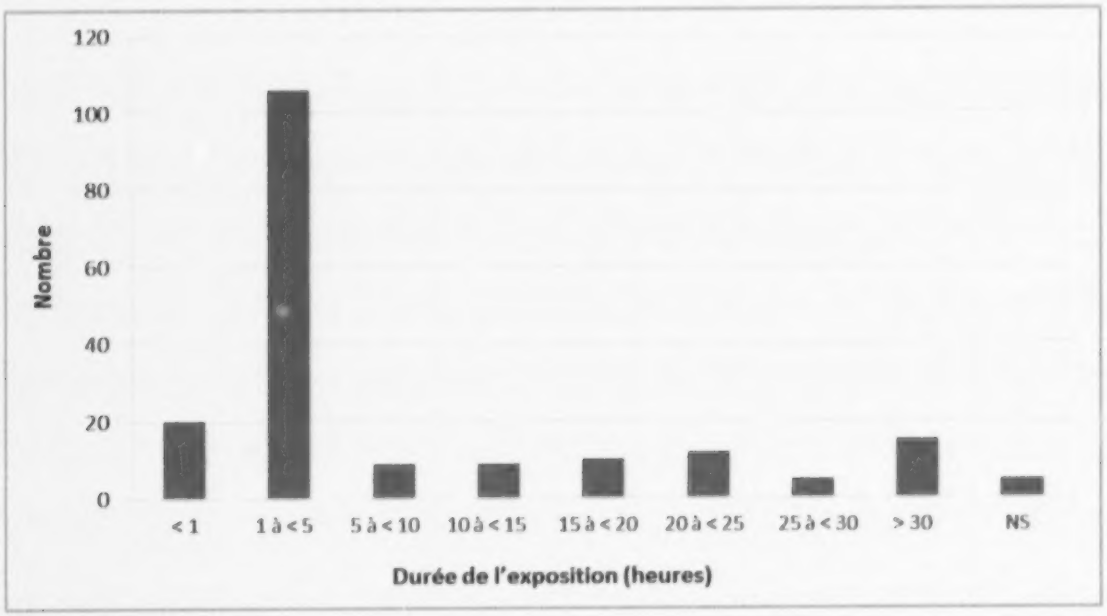

*Figure 14 : Nombre de durées d'exposition (jours) pour les essais de toxicité. Si la durée n'était pas indiquée de façon explicite, la publication a été classée comme non spécifiée (**NS**). Les données comportant des plages de valeurs n'ont pas été incluses (N = 8).*

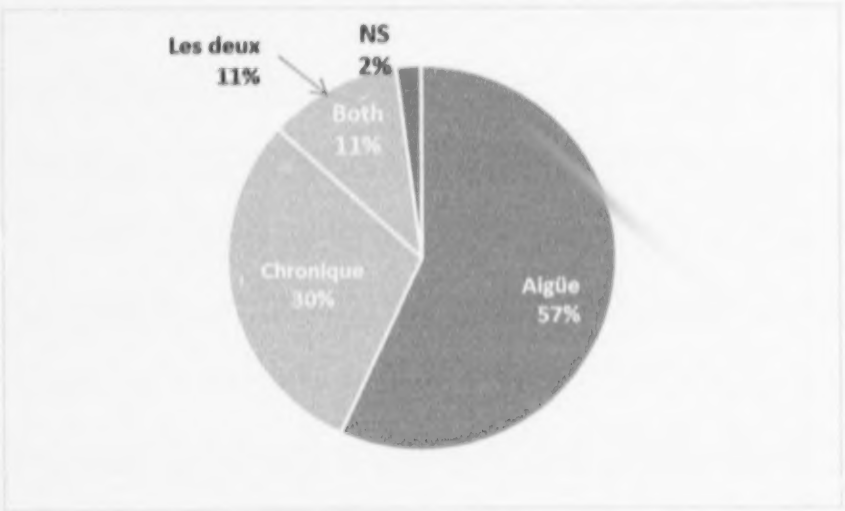

*Figure 15 : Pourcentage des expositions des essais de toxicité classées dans la catégorie **aiguë** (≤ quatre jours) ou **chronique** (> quatre jours). Les publications traitant des expositions aiguës et chroniques ont été classées dans la catégorie **les deux**. Si la durée d'exposition n'était pas indiquée, elle a été classée comme non spécifiée (**NS**).*

Les expositions aiguës étaient plus courantes que les expositions chroniques et peu d'études ont porté sur les deux. La gamme complète des durées d'exposition va de 0,04 à 240 jours. La

durée d'exposition la plus courante était de 1 à 5 jours (53,3 %), quatre jours (96 heures) étant la plus fréquente. Les essais de toxicité aiguë de quatre jours (96 h) sont la norme recommandée par le CROSERF (Aurand et Coelho 2005). Dans certains essais de toxicité, les durées d'exposition pour les essais de létalité aiguë ont été inférieures à 96 h, car les conceptions expérimentales simulées estimaient les temps d'exposition pendant des déversements réels, mais les CL50 pour les brèves expositions brouillent les comparaisons de toxicité entre les huiles. *Pour éviter ce problème, les essais de létalité aiguë devraient être exécutés pendant au moins 96 heures, avec des observations de la mortalité à des intervalles de 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 et 96 h afin de fournir les CL50 pour des périodes d'exposition courtes et normales (Sprague 1969).*

En plus de la caractérisation des durées d'exposition en toxicité aiguë ou chronique, chaque espèce mise à l'essai a été classée en fonction du stade biologique (Figure 16). Étant donné que certaines espèces ont été mises à l'essai à plus d'un stade biologique dans la même étude, il y a eu 165 entrées. Les stades biologiques testés le plus souvent sont les embryons (31,5 %), les juvéniles (26,1 %) et les larves (3 %); 9,1 % des documents n'ont pas précisé le stade biologique.

En général, on a utilisé des poissons juvéniles et adultes lorsque l'objectif de l'essai était d'évaluer la létalité aiguë ou de tester des réactions physiologiques. Les essais chroniques ont été généralement effectués avec des embryons afin d'évaluer les répercussions sur la reproduction. La sensibilité à l'exposition au pétrole varie en fonction du stade biologique de l'organisme mis à l'essai et de la nature des effets; les premiers stades de développement des poissons ont tendance à être les plus sensibles (McIntosh *et al.* 2010; Binder et Stageman 1983). Barron et Ka'aihue (2003) ont recommandé deux périodes d'exposition pour chaque espèce, huit heures afin d'évaluer les réponses aiguës et sept jours pour saisir les effets retardés, mais pas d'imiter les expositions chroniques. Il est également possible d'évaluer les effets retardés en conservant les poissons dans une eau limpide après l'exposition au pétrole. Des durées d'exposition supérieures à 30 jours ont été recommandées pour représenter au mieux tous les effets d'un déversement de pétrole, y compris les effets retardés (Heintz *et al.* 2000).

Les expériences menées avec des espèces, des pétroles et des paramètres bien caractérisés fournissent des points de repère importants pour évaluer la toxicité du bitume dilué.

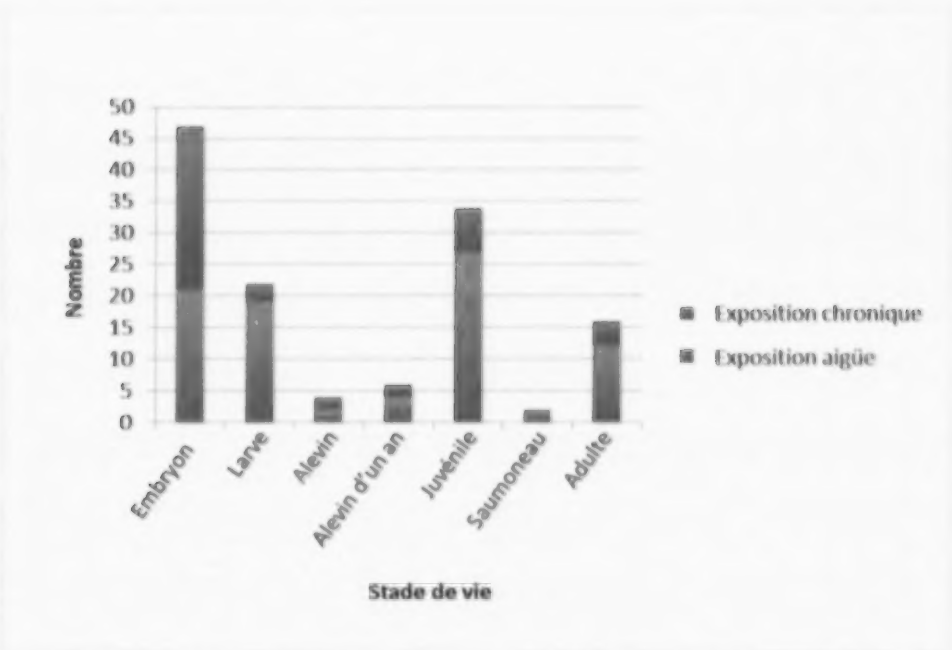

*Figure 16 : Nombre d'essais réalisés avec différents stades biologiques du poisson, différenciés en fonction de la toxicité aiguë (≤ 4 jours) ou chronique (> 4 jours). Si la durée d'exposition n'était pas indiquée de façon explicite, elle a été classée comme non spécifiée (**NS**).*

Besoin en matière de recherche

- Répéter des essais de toxicité avec divers produits de bitume dilué et différentes espèces typiques des milieux canadiens, selon des conceptions expérimentales conformes aux méthodes normalisées.

4.4.2 Facteurs abiotiques de l'exposition des poissons

Certains des facteurs abiotiques signalés dans les méthodes d'essai de toxicité étaient la photopériode et les caractéristiques de l'eau de dilution, y compris le pH, la température, la conductivité, l'alcalinité, la dureté et l'oxygène dissous. Bon nombre de ces caractéristiques n'ont pas été précisées de manière détaillée dans la plupart des publications. Lorsqu'elles étaient indiquées, soit elles ont été enregistrées sous la forme de moyennes de la période d'exposition, soit des mesures ont été fournies à des moments précis durant la période d'exposition.

Il est nécessaire de mesurer l'oxygène dissous dans les solutions d'essai pour les tests portant sur des effluents industriels (Doudoroff *et al.* 1951). Dans les expositions dans des récipients scellés sans aération, l'oxygène peut devenir rare, même avec les renouvellements statiques quotidiens des solutions d'essai (CONCAWE 1993, Girling *et al.* 1994). La méthode du CROSERF recommandait de ne pas retirer les animaux morts des solutions d'essai au cours de l'exposition. Cependant, dans les essais réalisés à des températures supérieures à 10 °C et pendant plus de 24 heures, la décomposition des poissons morts pourrait réduire les concentrations d'oxygène dissous (Sprague 1995) et les taux de dégradation microbienne du pétrole augmenteraient probablement. Conformément aux documents d'orientation technique

sur les essais de toxicité pour le poisson (p. ex., Environnement et Changement climatique Canada 1998; 2007; 2011), tous les organismes morts doivent être consignés et immédiatement retirés au moment où ils sont découverts.

La plupart des rapports de toxicité (63,4 %) n'ont pas précisé la photopériode pour l'essai. Lorsqu'elles sont décrites, les photopériodes les plus fréquemment indiquées étaient de 0:24, 12:12, 14:10 et 16:8 heures lumière:obscurité. Les photopériodes sont souvent déterminées par les conditions d'entreposage et d'acclimatation propres à l'espèce mise à l'essai (p. ex., ECCC 1998; 2007; 2011), plus que par toute considération de l'interaction entre le pétrole et la lumière. Les directives d'ECCC (1998 et 2007) sur les photopériodes sont propres à l'espèce et au stade biologique. Une photopériode de 16:8 lumière:obscurité avec lumière naturelle ou éclairage fluorescent a été recommandée pour toute la période pour les premiers stades biologiques et les alevins de la truite arc-en-ciel.

Selon les mêmes protocoles, il faut modifier les régimes de lumière pour travailler avec des produits chimiques qui sont photoactivés ou dégradés par les rayons ultraviolets, une recommandation qui est pertinente pour les essais réalisés avec les hydrocarbures. Le potentiel de phototoxicité est lié à la source de lumière (spectre des UV), au régime d'exposition, à l'espèce et au stade biologique. Un examen détaillé des options d'éclairage se trouve dans la norme ASTM E1733-95 (2014), *"Standard Guide for Use of Lighting in Laboratory testing"*. Les sources de lumière comprennent les lampes solaires (le spectre solaire naturel est les UVA (315-400 nm) et les autres UVB (280-315 nm à 5 %), les lampes fluorescentes (éclairage standard en laboratoire avec des UV minimaux [Barron *et al.* 2005] ou l'obscurité [Lee 2003]). On s'inquiète du fait que le régime lumineux pendant les essais puisse changer la composition et la toxicité de la solution d'essai par photodégradation ou photomodification. Le degré de photooxydation est propre à l'HAP et dépend de la longueur d'onde du spectre lumineux (Lee 2003). L'irradiation aux ultraviolets de la solution WAF avant les tests de toxicité menés sur des capucettes juvéniles n'a pas accru la toxicité (Little *et al.* 2000). De même, l'exposition au soleil de la solution WAF ou CEWAF de pétrole ANSC altéré avant les essais avec des larves de hareng n'a pas changé la toxicité. En revanche, la toxicité des solutions WAF ou CEWAF de pétrole ANSC altéré pour les larves de hareng a été multipliée par 50 lorsque les larves ont été exposées à la lumière du soleil au cours de l'essai de toxicité (Barron *et al.* 2003).

Le mécanisme de cette phototoxicité spectaculaire est la phototransformation des HAP accumulés dans les tissus semi-transparents (Barron et Ka'aihue 2001) des œufs et des larves (p. ex., Barron *et al.* 2003) et des poissons juvéniles (Little *et al.* 2000). Barron et Ka'aihue (2001) ont remarqué que le potentiel de multiplier par 1 000 la toxicité du pétrole et des HAP à la suite d'une exposition aux niveaux de lumière du jour des UV se comparait aux expositions à l'éclairage fluorescent typique dans les essais en laboratoire. De même, la mortalité des capucettes juvéniles exposées à une solution WAF de pétrole brut altéré était 5,6 fois supérieure pour les expositions aux UV que pour les expositions imitant un éclairage de bureau (Little *et al.* 2000). Le potentiel de phototoxicité dépend de l'espèce et du stade biologique; le risque de phototoxicité est plus élevé pour les organismes d'essai translucides que pour ceux qui ont un pigment bien développé dans la peau (Barron *et al.* 2005).

Les spectres des UV de l'éclairage de laboratoire sont rarement indiqués dans les études sur la toxicité du pétrole. Bien que les longueurs d'onde des UV de l'éclairage de laboratoire ne

Besoin en matière de recherche

- Évaluer la photosensibilisation des produits du bitume dilué dans les essais en laboratoire et dans l'éventail des intensités des UV typiques des environnements canadiens.

semblent pas problématiques, il est recommandé d'effectuer les tests de toxicité avec un éclairage de laboratoire à faible intensité qui comprend un minimum d'énergie lumineuse aux longueurs d'onde des UV. Il a été recommandé de mesurer l'intensité des UV dans les essais de toxicité standards, car elle peut être utile dans les modèles et être directement liée à des conditions propres au site (Barron et Ka'aihue 2001; 2003; Bragin *et al.* 2016). *Sinon, il est possible de déterminer le biais potentiel de photosensibilisation en ajoutant un témoin UV dans lequel les poissons sont exposés à une ou plusieurs concentrations de pétrole dans l'obscurité.*

4.4.3 Taille du récipient d'exposition

La taille des récipients d'exposition ou, plus correctement, le volume des solutions d'essai, joue un rôle clé pour déterminer l'ampleur de l'exposition des organismes d'essai et si les conditions d'essai sont constantes. D'après un examen des taux de respiration des poissons, Sprague (1969) a recommandé que le volume de la solution d'essai à chaque concentration d'essai soit suffisant pour répondre aux besoins en oxygène de l'espèce mise à l'essai. Le but était de faire en sorte que le stress respiratoire ne soit pas un facteur de confusion dans les essais de toxicité sans aération. Ce critère a également été un substitut pour veiller à ce que les volumes de la solution d'essai soient suffisants pour que la bioaccumulation de la substance d'essai par les poissons ne réduise pas nettement les concentrations d'essai, en supposant que les taux d'absorption d'oxygène étaient à peu près équivalents aux taux d'absorption des substances toxiques.

Pour la truite arc-en-ciel juvénile, les volumes recommandés équivalaient à 2 à 3 litres d'eau par gramme de biomasse de poisson par 24 h. L'actuelle méthode d'essai standard d'Environnement et Changement climatique Canada pour la létalité aiguë des substances uniques ou des effluents (EC 2007) utilise un critère semblable, mais l'exprime sous la forme d'un taux de charge maximal de < 0,5 g de biomasse de poisson par litre à 15 °C (soit 2 l/g/d). Si l'on applique cette recommandation, il faudrait 80 litres de solution d'essai (un grand aquarium) pour un essai statique sans renouvellement de quatre jours avec dix poissons de 1,0 gramme. Si les solutions sont renouvelées toutes les 24 h, les volumes de solution pourraient être proportionnellement moins grands (20 litres), même si le volume total sur 4 jours est encore de 80 litres. Pour les essais à flux direct, on pourrait utiliser des contenants d'essai beaucoup plus petits, à condition que le débit total de la solution d'essai soit équivalent à 80 litres en 96 h (soit un débit minimal de 14 ml/min.). Pour les essais réalisés avec 10 embryons de poissons pesant 1 mg chacun, le volume recommandé de la solution d'essai serait 1 000 fois plus petit, soit 80 ml en 96 h.

Les taux de charge de la biomasse et les volumes d'essai recommandés par Sprague (1969) ont été élaborés pour la truite et devraient être modifiés pour différentes espèces et différentes températures en fonction des taux de consommation d'oxygène, mesurés ou déclarés. Si ces données ne sont pas disponibles, les exigences pour la truite sont prudentes et pourraient être adoptées pour la plupart des espèces.

Les taux de charge de la biomasse recommandés pour les essais de toxicité devraient limiter l'épuisement des substances mises à l'essai dans la solution, mais il y a un problème supplémentaire pour les hydrocarbures hydrophobes dans les essais menés avec le pétrole. Les composés hydrophobes se séparent de l'eau pour adhérer aux surfaces des réservoirs. Par conséquent, les concentrations dans les solutions diminueront rapidement au fil du temps, même en l'absence de poissons. Lorsque l'on réduit la taille des contenants d'essai, le ratio superficie-volume augmente, ce qui accélérera la perte proportionnelle des hydrocarbures dans la solution. Bien que le taux de partage demeure constant, la perte proportionnelle des hydrocarbures dans les petits contenants de solution d'essai sera beaucoup plus importante que dans les grands contenants. Indépendamment de la taille des poissons, des volumes de réservoir plus grands donneront des solutions d'essai plus stables et une demi-vie plus longue de certaines composantes. La perte d'hydrocarbures des solutions d'essai serait encore aggravée par les matières organiques particulaires ou dissoutes provenant des déchets de poisson ou d'aliments pour poissons non consommés. C'est pourquoi il n'est pas recommandé de nourrir les poissons avant ou pendant les essais de létalité aiguë (c.-à-d. 96 h) (Environnement Canada 2007). *Lorsqu'il est nécessaire de nourrir les poissons afin de maintenir leur santé pendant des expositions plus prolongées, il faut déployer des efforts supplémentaires pour remplacer les solutions d'essai et les contenants d'essai immédiatement après l'alimentation, et nettoyer les contenants d'essai chaque jour de manière à éviter l'accumulation de débris et de biofilms qui absorbent les hydrocarbures ou qui abritent des bactéries susceptibles de créer des métabolites des hydrocarbures.*

L'analyse détaillée des données publiées sur la toxicité du pétrole montre que la plupart des documents (65,1 %) ont déclaré des volumes de réservoir ou de solution d'essai compris entre < 1 ml (embryons dans des cellules de microplaque) à < 100 litres (poissons juvéniles dans des réservoirs) (Figure 17); la taille de récipient la plus courante était comprise entre 10 et 100 litres (27,6 %). Il est difficile de replacer ces volumes en contexte, car la charge totale (g biomasse/l/d) de poissons dans chaque réservoir n'était pas souvent indiquée. Bien que les très petits récipients d'essai (≤100 ml; 8,6 % des essais publiés; figure 17) aient pu s'avérer pratiques et économiques, les toxicités estimées ont probablement été brouillées par les changements des concentrations de pétrole au cours de l'essai dus à l'excès de biomasse ou à l'absorption sur les surfaces du réservoir. Dans l'ensemble, le biais potentiel réside dans une sous-estimation de la toxicité. La seule façon de veiller à ce que les volumes des réservoirs ne brouillent pas les essais de toxicité consiste à mesurer les concentrations des substances mises à l'essai dans les solutions d'essai et de calculer la toxicité en fonction des valeurs mesurées (voir la section 4.3 sur la chimie). *En raison de l'importance de ce biais, il faut toujours préciser les volumes du réservoir d'essai et la biomasse des poissons dans chaque réservoir.*

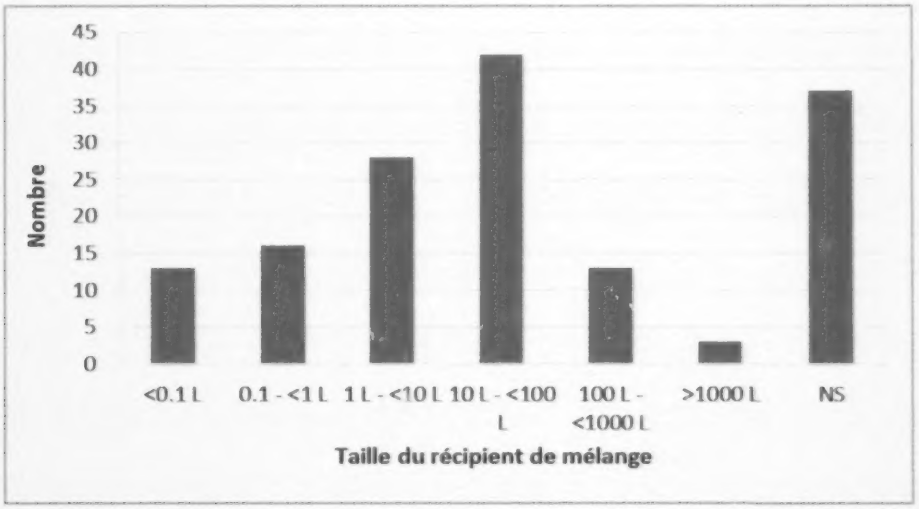

*Figure 17 : Nombre de volumes de récipient d'exposition (litres) utilisés dans les essais de toxicité du pétrole. Si le volume du récipient d'exposition n'était pas indiqué de façon explicite, il a été classé comme non spécifié (**NS**) (N=152).*

Le bitume dilué s'altérant rapidement et étant plus adhésif que le pétrole brut classique, il faut prendre en compte les pertes potentielles de bitume dilué dans les récipients d'exposition dans les conceptions expérimentales, de même que l'ampleur des pertes, mesurée par la caractérisation chimique des solutions d'essai et l'accumulation de pétrole sur les parois du récipient au fil du temps.

4.4.4 Matériau du récipient d'exposition

Les réservoirs d'exposition peuvent être fabriqués en verre, en acier inoxydable ou en plastique de différentes formes (p. ex., polyéthylène, polycarbonate, Téflon), et les mêmes matériaux peuvent être utilisés dans les tubes, les raccords de tuyau ou les appareils utilisés pour préparer les solutions d'essai (pipettes, béchers, barreaux d'agitation, etc.). La plupart des hydrocarbures pétroliers sont hydrophobes et se sépareront des solutions d'essai pour adhérer aux matériaux qui composent une partie d'un système d'essai. De même, les gouttelettes de pétrole en suspension adhéreront à la majorité des surfaces. De ce fait, les concentrations d'hydrocarbures dans les solutions d'essai diminuent au cours de la préparation des solutions et des essais de toxicité (p. ex., Wu *et al.* 2012) et peuvent approcher des valeurs non perceptibles dans les 24 h, l'intervalle type de remplacement des solutions pour les essais à renouvellement statiques. Intuitivement, les plastiques qui absorbent les matières organiques (p. ex., le polyéthylène à faible densité) devraient être les moins adaptés aux essais de toxicité du pétrole et provoqueraient les changements les plus importants et les plus rapides dans les concentrations de pétrole. Par ailleurs, le verre et l'acier inoxydable devraient absorber le moins d'hydrocarbures dissous et être les matériaux de choix, bien que les gouttelettes de pétrole puissent encore y adhérer. Des essais de la biodisponibilité, pour les poissons, de composés hydrophobes provenant d'effluents d'usine de pâte à papier ont démontré que les aquariums en verre construits avec des joints d'étanchéité en silicone conservaient des concentrations de composés hydrophobes mesurables après un test. Le partage à partir du silicone contaminé dans l'eau non contaminée était suffisant pour provoquer une accumulation mesurable à l'aide des poissons témoins (Hodson, observations non publiées). La capacité du joint de silicone à accumuler les composés hydrophobes est le fondement des recommandations d'utiliser des

films de silicone comme échantillonneurs passifs pour caractériser chimiquement les solutions d'essai (Redman *et al.* 2014). *Par conséquent, les essais de toxicité du pétrole ne doivent pas être menés avec des aquariums construits avec des joints d'étanchéité en silicone, car les résultats seront faussés par une perte plus rapide d'hydrocarbures de la solution que dans des récipients entièrement en verre, et le risque sera accru de contaminer les solutions témoins lorsque l'on réutilisera les réservoirs, ce qui réduit la capacité de détecter la toxicité.*

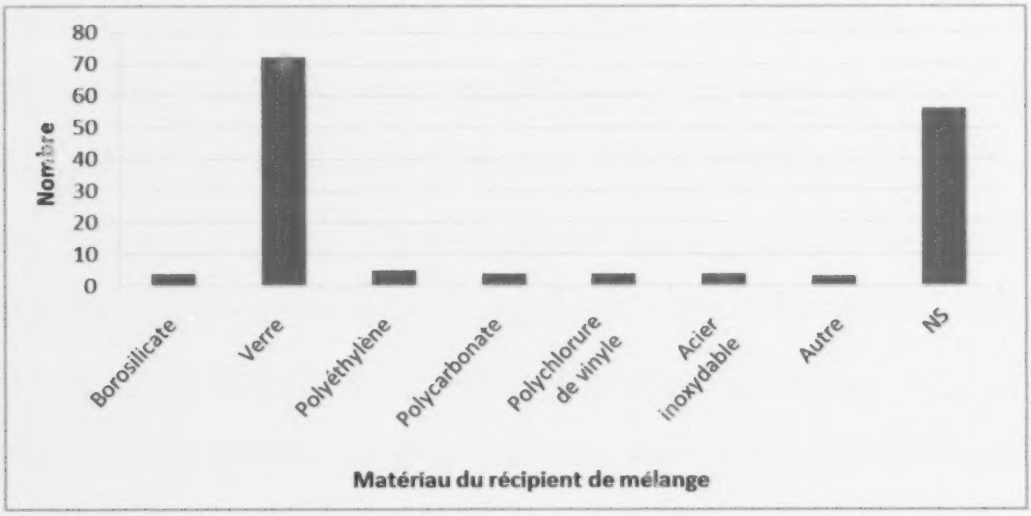

Figure 18 : Nombre de matériaux de récipients d'exposition indiqués dans cette analyse documentaire (N=152). Les matériaux qui ont été mentionnés ≤ trois fois ont été classés dans la catégorie ***Autre****. Si le matériau n'était pas indiqué de façon explicite, il a été classé comme non spécifié (****NS****).*

Parmi les 144 études examinées, 152 entrées de récipients d'exposition ont été déterminées. Sur ces 152 entrées, 63,2 % ont indiqué le type de matériau dans les réservoirs d'essai (Figure 18), à savoir le verre dans 80 % des cas. Si un matériau de récipient d'exposition a été signalé trois fois ou moins, il a été classé dans la catégorie **Autre**; ces entrées incluaient les récipients d'exposition en fibre de verre et en béton. Les 36,8 % restants n'ont pas précisé le type de matériau des réservoirs d'exposition et ont été désignés comme non spécifiés (**NS**). Aucune étude n'a décrit précisément la construction des réservoirs et la possibilité de contact entre du silicone et les solutions d'essai. Il n'y a pas eu d'évaluation systématique des interactions entre les matériaux du réservoir d'essai et l'étendue et la nature des changements dans la composition de la solution; il s'agit d'un besoin de recherche important, en particulier pour les hydrocarbures visqueux riches en résines et en asphaltènes, comme les produits du bitume dilué.

Besoin en matière de recherche

- Afin de déterminer les récipients d'essai de toxicité les mieux adaptés, évaluer l'absorption du pétrole des solutions d'essai pour divers matériaux de réservoir ainsi que l'étendue, la chronologie et la nature des changements dans la composition chimique des solutions d'essai.

4.4.5 Régime d'exposition

Les organismes mis à l'essai peuvent être exposés à des solutions d'essai dans des expositions statiques, semi-statiques, intermittentes ou des systèmes à flux continu. Les expositions statiques sans renouvellement (**SSR**) font référence à des essais dans lesquels les poissons sont exposés à une seule aliquote de la solution d'essai pendant la durée du test, sans renouvellement ou rafraîchissement de la substance d'essai, souvent pendant des périodes pouvant aller jusqu'à 96 h. Si la substance d'essai est très soluble dans l'eau (p. ex., le sel), les concentrations d'exposition peuvent demeurer constantes tout au long de l'essai. Lorsque la substance d'essai est hydrophobe (p. ex., pétrole, HAP), il y a une décroissance continue des concentrations tout au long de l'essai, souvent jusqu'à des concentrations indécelables dans les 24 h suivant le début du test (Kiparissis *et al.* 2003). Dans les essais à renouvellement semi-statiques ou statiques (**RS**), les solutions d'essai sont renouvelées périodiquement et demeurent statiques pendant des intervalles définis. Par exemple, selon un protocole de renouvellement quotidien statique, la solution serait remplacée toutes les 24 heures. Pour les substances dont la concentration diminue pendant l'essai, le régime d'exposition ressemble à une série de pointes, descendant souvent à zéro dans l'intervalle de renouvellement. Pendant les expositions intermittentes (**I**), on alterne l'exposition aux solutions d'essai et l'exposition à l'eau limpide, chacune étant de durée fixe ou variable (Aurand et Coelho 2005). Certains essais peuvent inclure une période unique de l'exposition suivie d'une exposition prolongée à l'eau limpide pour évaluer le potentiel d'effets retardés. Dans les protocoles à flux direct constant (**FDC**), on renouvelle les solutions d'essai en ajoutant continuellement la substance d'essai à un débit d'eau continu, avec peu ou pas de diminution des concentrations au fil du temps, bien qu'il puisse y avoir une variation aléatoire (p. ex., Nordtug *et al.* 2011). On peut aussi procéder à des expositions constantes (**C**) avec des systèmes de mélange sélectif compartimenté; les substances mises à l'essai en fortes concentrations se séparent alors dans l'eau pour adhérer à un substrat solide (p. ex., Kiparissis *et al.* 2013). Chaque concentration d'essai est déterminée par le gradient de concentration entre le film et l'eau, le coefficient de partage de la substance d'essai et sa solubilité dans l'eau. Pour les essais effectués avec l'huile, une stratégie courante consiste à faire couler l'eau dans une colonne remplie de gravier recouvert d'huile (Marty *et al.* 1997). Bien que cela donne des concentrations plus stables dans les expositions aiguës (< 1 semaine), les concentrations finissent par diminuer considérablement au cours des semaines et des mois pour les expositions chroniques au fur et à mesure que les films de pétrole perdent leurs hydrocarbures plus hydrosolubles sous l'effet de l'altération (lavage à l'eau) (Martin *et al.* 2014).

Ce sont les régimes à renouvellement statiques, sans renouvellement statiques et à flux direct qui ont été les plus fréquemment utilisés, soit dans 89,8 % de tous les essais (Tableau 6).

Les protocoles d'exposition qui produisent des concentrations transitoires peuvent imiter les conditions propres au site d'un déversement. Par exemple, la méthode du CROSERF pour tester le pétrole comprend l'ajout continu d'eau limpide à chaque concentration de pétrole dans un gradient, de manière à ce que les concentrations diminuent jusqu'à devenir non perceptibles en six heures ou moins. Cela pourrait représenter la dilution rapide du pétrole déversé à un site en eau libre, mais pas les conditions de l'éruption d'un puits ou d'un déversement provenant d'un pipeline, dans lesquelles de grandes quantités d'hydrocarbures sont déversées pendant une période prolongée.

*Tableau 6 : Nombre de régimes d'exposition. Les régimes d'exposition ont été classés en protocoles à renouvellement semi-statiques ou statiques (**RS**), sans renouvellement statiques (**SRS**), à flux direct constant (**FDC**), en expositions intermittentes (**I**) et en expositions constantes (**C**). Lorsque les régimes d'exposition n'ont pas été précisés, l'entrée a été classée comme **NS**.*

Type d'exposition	Nombre	% du total des entrées
RS	45	26,9
SRS	61	36,5
FCD	44	26,3
I	4	2,4
C	10	6
NS	3	1,8
Nombre total d'entrées	**167**	**S.O.**

Les résultats des essais effectués avec des concentrations variables dans le temps sont difficiles à caractériser parce que les paramètres (p. ex., CL50 sur 96 h) peuvent être fondés sur la concentration initiale, la concentration finale, la concentration moyenne finale ou la concentration intégrée dans le temps (Lee *et al.* 2015). L'exposition totale est également importante, pas seulement la concentration de pointe. Par exemple, une exposition continue d'embryons d'aiglefin de l'Atlantique à de faibles concentrations de pétrole a été aussi toxique que leur exposition intermittente à une concentration plus élevée (Sørhus *et al.* 2015). La stabilité des concentrations d'exposition au fil du temps dépend des différents régimes d'exposition et de la préparation des solutions huile-eau. Les expositions les plus stables sont celles obtenues par une production continue de solutions fraîches de pétrole dans l'eau (p. ex., Nordtug *et al.* 2011). Les systèmes à flux continu et les colonnes de gravier mazouté sont probablement les meilleurs outils d'exposition pour comparer réellement la toxicité entre les huiles, entre les espèces et entre les conditions d'essai (p. ex., la température). Les comparaisons effectuées à l'aide d'autres méthodes risquent beaucoup plus d'être brouillées par les différentes conditions d'essai entre les laboratoires ou les interactions des caractéristiques de l'huile avec la méthode d'essai. Par exemple, les préparations de solutions WAF de pétrole léger par brassage intégreront probablement davantage de pétrole finement particulaire et d'hydrocarbures dissous dans les solutions que les solutions WAF de pétrole lourd, principalement parce que les différences de viscosité et de tensions interfaciales entre les pétroles lourds et légers déterminent la formation des gouttelettes pour un niveau donné d'énergie de mélange.

La dispersion chimique (CEWAF) peut également améliorer les comparaisons de toxicité entre les pétroles. Les agents dispersants interagissent avec les films de pétrole pour réduire les effets de la viscosité sur la formation des gouttelettes et les effets de confusion de la viscosité du pétrole sur la toxicité apparente. Dans les comparaisons de la biodisponibilité ou de la toxicité chronique entre les huiles, la quantité de CEWAF ajoutée aux solutions d'essai pour provoquer un niveau d'effet donné était inférieure de 6 à 1 100 fois à la quantité de WAF nécessaire (Ramachandran *et al.* 2004; Adams *et al.* 2014b). Lorsque les résultats étaient exprimés en tant que quantité d'hydrocarbures mesurée dans les solutions d'essai, il n'y avait pratiquement pas de différence entre les effets WAF et CEWAF. Cela renforce la nécessité de mesurer les quantités d'hydrocarbures dans les solutions d'essai pour pouvoir comparer la toxicité des huiles sans les effets de confusion de la méthode de préparation de la solution.

Le choix des régimes d'exposition est essentiel pour déterminer le résultat des essais de toxicité et leur utilité pour les ÉRÉ. Dans le passé, une grande proportion des essais de toxicité des hydrocarbures utilisaient des expositions semi-statiques ou statiques en raison de leur

simplicité et de leur faible coût, mais si les résultats ne sont pas faciles à comparer ou à appliquer dans les ÉRÉ, les ressources dépensées ont peut-être été gaspillées. Des recherches sont nécessaires pour améliorer les conceptions d'essai existantes. Pour les tests utilisant des concentrations d'hydrocarbures variables dans le temps dans les solutions d'essai, il faudrait évaluer les interactions entre le temps, la concentration et l'étendue des effets à l'aide de modèles statistiques afin de déterminer s'il existe des relations uniformes et prévisibles qui permettraient d'améliorer les comparaisons entre les conditions des essais et entre les laboratoires d'essai. *Les conceptions d'essais avec des concentrations d'hydrocarbures variables dans le temps devraient être guidées par les tendances temporelles observées des concentrations d'hydrocarbures aux sites de déversements de pétrole réels. Quelle que soit la méthode d'essai de toxicité retenue pour le bitume dilué, en particulier pour les produits non altérés, la caractérisation chimique des solutions d'essai est essentielle pour décrire les changements dans la composition et la concentration du pétrole au fil du temps.*

Besoins en recherche

- Déterminer et évaluer des protocoles d'essai pratiques et rentables pour maintenir les concentrations d'hydrocarbures constantes dans les solutions d'essai pendant la durée des essais de toxicité.
- Élaborer des objectifs de qualité des données afin d'indiquer la fiabilité des résultats des analyses pour la caractérisation des hydrocarbures et des solutions d'essai et afin de comparer les résultats entre plusieurs laboratoires.
- Élaborer des modèles statistiques qui intègrent les concentrations d'hydrocarbures dans les solutions d'essai au fil du temps afin de générer un paramètre stable de l'exposition et de la toxicité calculée.
- Modéliser la toxicité pendant le temps d'exposition pour les essais de toxicité du pétrole avec des concentrations de pétrole variables dans le temps en vue de déterminer le meilleur indicateur de la toxicité, c.-à-d. la concentration initiale, moyenne, finale ou intégrée dans le temps.

4.4.6 Effets mesurés et paramètres

La relation entre la gravité des effets toxiques et l'exposition aux hydrocarbures sert à calculer des paramètres précis qui peuvent être comparés entre les études. Les effets mesurés comprennent ceux des conséquences létales et sublétales, comme la mortalité, le développement et la morbidité. Les effets létaux et sublétaux peuvent être mesurés à mi-exposition, directement après l'exposition ou à un ou des moments précis après l'exposition, après le transfert en eau limpide (c.-à-d. effets prolongés ou retardés).

Selon la conception de l'expérience et les techniques de mesure, les paramètres peuvent être mesurés pendant toute la durée d'exposition ou nécessiter l'échantillonnage ou l'analyse des organismes après un temps d'exposition précis ou à un stade de développement donné. Les paramètres sont exprimés comme l'effet mesuré après une durée d'exposition fixe. Par exemple, la concentration d'huile requise pour causer une toxicité chronique à 50 % des organismes mis à l'essai après une exposition de 7 jours serait appelée concentration efficace médiane (CE50) à sept jours.

La concentration sans effet observé (CSEO) est la concentration la plus élevée qui ne provoque pas d'effet statistiquement significatif par rapport aux témoins. La concentration minimale avec effet observé (CMEO) est la concertation la plus basse qui provoque une réponse significativement différente des témoins. Les effets peuvent également être indiqués à des

niveaux d'effet précis. La CSEO et la CMEO ont été désignées comme étant les paramètres les plus souvent utilisés en écotoxicologie par Harris *et al.* (2014), mais elles ont été beaucoup critiquées en raison du biais potentiel causé par l'espacement irrégulier des concentrations d'exposition mesurées et leur grande sensibilité aux écarts au seuil de toxicité.

Trente des 144 publications ont présenté des paramètres multiples. Si l'heure à laquelle la mesure a été prise n'était pas indiquée, le paramètre a été consigné sans mention d'heure. Si un paramètre donné a été signalé trois fois ou moins, il a été classé dans la catégorie **Autre**; ces entrées comprenaient la CE10, la CE20, la CE80, la CL10, la CL90 et la CL100. **PP** désigne les essais pour lesquels on n'a pas calculé de valeur de paramètre.

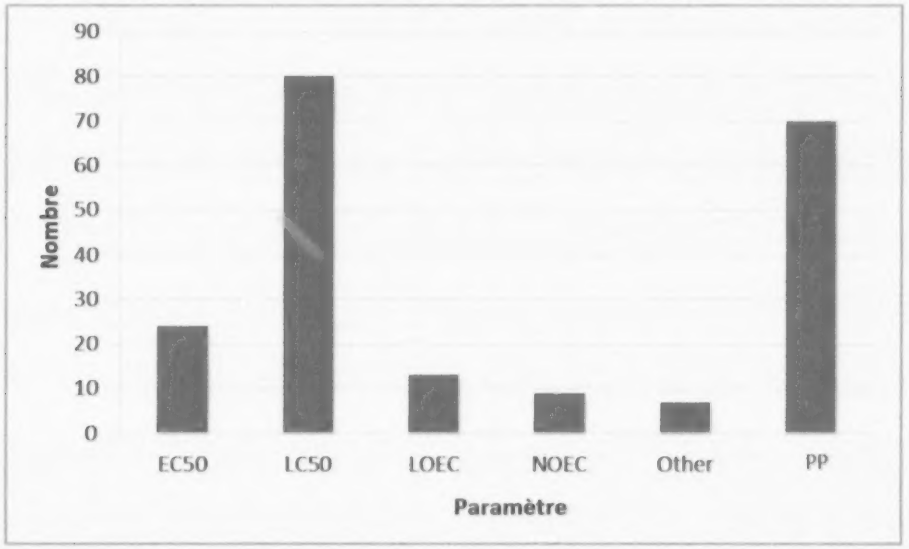

*Figure 19 : Nombre de paramètres déclaré; concentration efficace médiane (**CE50**), concentration létale médiane (**CL50**), concentration minimale avec effet observé (**CMEO**) et concentration sans effet observé (**CSEO**) (N=203). Si un paramètre donné a été signalé ≤ trois fois, il a été classé dans la catégorie **Autre**. **PP** désigne les essais pour lesquels on n'a pas calculé de paramètre.*

Pour les essais de toxicité du pétrole, la **CL50** et la **CE50** sont les paramètres les plus courants indiqués. Les effets sublétaux ont été principalement observés dans les embryons de poisson et comprennent les malformations, le développement freiné, la capacité natatoire réduite, la maladie du sac bleu, l'altération de l'expression génique et des malformations cardiovasculaires. La maladie du sac bleu est une maladie non infectieuse caractérisée par la rupture de la membrane lipidique et l'accumulation de fluides dans les sacs vitellin et péricardique, des hémorragies corporelles et oculaires, l'érosion des nageoires, des malformations cranofaciales et la courbure de la colonne vertébrale. Les poissons présentant les signes les plus graves de la maladie du sac bleu n'atteindront probablement pas l'âge adulte. L'exposition aux HAP séparés du pétrole s'accompagne souvent aussi d'une altération de l'expression génique, notamment des gènes qui codent les enzymes des cytochromes P450 (p.ex., le CYP14) (Timme-Laragy *et al.* 2007). L'induction d'enzymes du CYP1A et les enzymes médiant le stress oxydatif dû au métabolisme des HAP constituent des indicateurs sensibles de l'exposition aux HAP chez les organismes aquatiques (Fragoso 1998, Madison *et al.* 2015). Les paramètres des effets sublétaux chroniques (p. ex., la CE50 à 17 jours) se produisent généralement à des concentrations de pétrole plus basses que la létalité aiguë, et sont un indicateur plus sensible des effets potentiels sur les populations de poissons.

Les malformations cardiovasculaires causées par l'exposition aux HAP pétrogéniques (Incardona *et al.* 2009, Incardona *et al.* 2013) peuvent entraîner des réductions du débit cardiaque et de la capacité de nage des poissons survivants juvéniles et se traduire par des taux de survie plus bas chez les poissons exposés à l'état sauvage (Incardona *et al.* 2009). Avec les percées réalisées dans les techniques moléculaires, des paramètres plus sensibles ont été élaborés pour évaluer les changements dans l'état de santé physiologique, comme l'expression génique chez les embryons de poissons exposés à du bitume dilué (p. ex., Madison *et al.* 2015).

4.5 APERÇU DES MÉTHODES D'ESSAI DE TOXICITÉ DU PÉTROLE RAPPORTÉES

4.5.1 Variabilité des méthodes représentées dans l'analyse

Cette analyse représente une variété de méthodes qui pourraient changer les résultats des essais de toxicité. Il s'agit d'un examen partiel qui n'englobe pas divers travaux de recherche, particulièrement la littérature grise, qui sortent de sa portée.

Les ouvrages publiés après l'élaboration des documents d'orientation du CROSERF indiquent que les variations dans les pétroles mises à l'essai, les méthodes utilisées pour produire les solutions d'essai et les méthodes d'exposition des poissons aux hydrocarbures peuvent encore mener à une interprétation erronée des résultats et prévenir les comparaisons entre les études de toxicité du pétrole.

La variabilité entre les méthodes pour les essais de toxicité des solutions WAF était supérieure que pour les solutions CEWAF. Cela peut être lié à l'absence apparente d'effort organisé pour normaliser les méthodes WAF pour d'autres scénarios environnementaux, notamment les interactions du pétrole avec les sédiments du fond ou le mélange à énergie élevée du pétrole dans les rivières. Cela a amené plusieurs groupes de recherche à élaborer leurs propres méthodes, y compris des méthodes de production des solutions HEWAF (p. ex., Alloy *et al.* 2016).

La diversité des méthodes est en partie liée aux différents objectifs des essais (p. ex., recherches ou essais réglementaires), aux modifications apportées à des protocoles normalisés pour les adapter à différents scénarios et à l'élaboration de méthodes de rechange. George-Ares et Clark (2000) ont constaté la variabilité de la toxicité des agents dispersants en se fondant sur les données compilées à partir de la documentation, car toutes les études n'ont pas été menées à l'appui du processus décisionnel relatif à l'utilisation des dispersants.

4.5.2 Examen des méthodes utilisées pour évaluer la toxicité du bitume dilué

Trois études de la toxicité du bitume dilué pour le poisson ont paru dans des publications à comité de lecture : Madison *et al.* (2015), Philibert *et al.* (2016) et Alderman *et al.* (2016). Les deux premières se sont référées à un protocole du CROSERF modifié, décrit par Singer *et al.* (2000), sur lequel est fondée leur conception pour produire les solutions d'essai.

Madison *et al.* (2015) ont évalué la toxicité de solutions WAF et CEWAF de pétrole AWB pour des embryons de médaka japonais, de la fécondation à l'éclosion (17 jours d'exposition). Les méthodes utilisées pour préparer les solutions d'essai WAF et CEWAF se sont inspirées d'Adams *et al.* (2014a, b) et de Martin *et al.* (2014), qui appliquaient les modifications les plus courantes du protocole de Singer *et al.* (2000). Pour résumer, les solutions étaient préparées chaque jour dans des béchers gradués à faible énergie de mélange selon un ratio pétrole/eau de 1:9 sur une plaque d'agitation magnétique (profondeur du tourbillon de 20 à 25 %). Les solutions WAF avaient été mélangées pendant 18 heures avec une période de sédimentation d'une heure; les solutions CEWAF avaient été mélangées pendant 18 heures, après quoi le

Corexit 9500 avait été appliqué selon un ratio dispersant/pétrole de 1:10 pendant une heure supplémentaire de mélange, suivie d'une heure de sédimentation. Dans les deux types de solutions, WAF et CEWAF, le pétrole flottant a été retiré du bécher afin de permettre la collecte de la phase aqueuse. Les auteurs ont observé la variabilité de l'efficacité de la dispersion du bitume dilué et ont émis l'hypothèse que les difficultés à disperser le bitume dilué pourraient avoir brouillé la toxicité mesurée.

Dans Philibert *et al.* (2016), la toxicité du bitume dilué WAF pour les embryons de poisson-zèbre a été comparée à celles des WAF du composite sulfureux moyen (« Medium Sour Composite– MSC » en anglais) et au mélange non corrosif mixte (« Mixed Sweet Blend – MSB » en anglais). Dans cette expérience, les solutions WAF ont également été préparées selon des méthodes fondées sur Singer *et al.* (2000). On a mélangé le pétrole et l'eau à un ratio de 1:10 (1,8 litre de milieu de culture d'embryons plus 180 ml de pétrole) dans un flacon d'aspiration fermé de 2 litres à environ 100 tr/min pendant 20 heures, puis on a laissé un temps de sédimentation de 4 heures avant de collecter la solution WAF non filtrée, de corriger le pH et de la diluer en solutions d'essai pour procéder à l'exposition statique quotidienne des embryons de poisson-zèbre de 30 minutes à 7 jours après la fertilisation.

Alderman *et al.* (2016) ont exposé des tacons de saumon rouge à une solution WSF produite par un débit d'eau continu sur des billes de céramique enduites d'un mélange estival de CLB pendant une ou quatre semaines. Les billes avaient trempé dans le bitume dilué pendant environ 30 minutes. L'eau passait sur les différentes charges de billes et était recueillie dans des réservoirs de tête de 2 litres d'où elle était pompée dans deux réservoirs pour les expériences.

Notre expérience (Adams, observations non publiées) tirée de la préparation de la solution CEWAF de pétrole AWB et de mélange hivernal de CLB avec une énergie de mélange moyenne sur une plaque d'agitation magnétique a montré que la profondeur du tourbillon de pétrole augmentait durant les premières heures de la période de mélange, ce qui n'a pas été observé avec les solutions CEWAF de pétroles bruts classiques. Cela veut dire que l'énergie de mélange nécessaire pour créer une profondeur de tourbillon de 20 à 25 % était plus grande pendant le mélange initial que quelques heures plus tard, lorsqu'elle a été réduite pour maintenir le tourbillon de 20 à 25 % et l'empêcher de heurter le barreau d'agitation. Il est possible que la plaque d'agitation n'ait pas maintenu une vitesse de mélange constante, mais aussi que la vitesse de brassage ait changé au fur et à mesure que les propriétés des hydrocarbures brassés changeaient. Ce changement de comportement du système brassé pétrole:eau peut être attribuable à l'altération du bitume dilué pendant les 18 heures de brassage, et a probablement contribué à la variabilité entre les préparations CEWAF pour le même pétrole. Nous avons également remarqué que le temps nécessaire pour parvenir à la rupture du tourbillon après l'application du dispersant variait d'un jour à l'autre. Les méthodes utilisant une énergie de mélange plus grande pourraient produire des dispersions plus reproductibles en surmontant la résistance précoce à la formation d'un tourbillon.

Des études plus approfondies sont nécessaires pour comprendre les changements des propriétés physiques et chimiques du bitume dilué pendant la préparation des solutions d'essai, et au cours de l'essai de toxicité lui-même, et expliquer comment ces changements interagissent avec la toxicité observée.

5 CADRE PROPOSÉ POUR ÉLABORER DES PROTOCOLES NORMALISÉS

Cette analyse documentaire a démontré une diversité de méthodes pour tous les aspects des essais de toxicité, avec de nombreuses variations de protocoles normalisés souvent mal décrites. Plusieurs examens ont également établi des limites du protocole du CROSERF et

suggéré des modifications à apporter aux méthodes telles que le mélange d'huile et d'eau ou l'application de l'agent dispersant (section 3.3.4). Il est donc difficile de recommander des méthodes particulières, ou des modifications à apporter aux méthodes, pour répondre aux caractéristiques uniques du bitume dilué sans d'abord régler les problèmes associés aux essais portant sur les hydrocarbures en général. Des recommandations pour composer avec les hydrocarbures aux propriétés uniques (p. ex. sur les essais effectués avec des hydrocarbures très altérés, Barron et Ka'aihue (2003) section 4.3) pourraient éliminer la nécessité d'avoir des méthodes propres au bitume dilué. Les protocoles doivent être suffisamment flexibles pour s'adapter à la diversité des objectifs inhérents aux essais de toxicité réglementaires, les ÉRÉ et les ÉIE, et pour générer des données faciles à comparer entre les études. Étant donné que le processus initial du CROSERF était fondé sur le consensus, entre les praticiens de l'industrie, du gouvernement et du milieu universitaire, il faudrait suivre un processus similaire afin que toutes les recommandations répondent aux besoins des utilisateurs des méthodes. Le cadre proposé, présenté dans ce chapitre, décrit le protocole du CROSERF pour tous les aspects des essais de toxicité (annexe 1), mis à jour pour reconnaître les modifications largement acceptées des méthodes originales, y compris celles qui sont recommandées dans la présente analyse, et des conseils précis pour les essais effectués avec des produits du bitume dilué.

5.1 COMBINER LES ESSAIS STANDARDS À D'AUTRES QUI SIMULENT DES CONDITIONS PROPRES AU SITE

Comme nous l'avons vu au chapitre 3, les essais de toxicité peuvent être classés dans deux grandes catégories en fonction de leurs objectifs principaux. Certaines études comparent la toxicité entre différents types d'hydrocarbures, espèces mises à l'essai et conditions environnementales (p. ex., température, salinité), et s'appuient sur des méthodes normalisées pour permettre ces comparaisons. Ces analyses sont courantes dans les essais réglementaires. Par exemple, un essai normalisé peut comprendre un éventail de concentrations d'essai dans lequel la concentration la plus élevée est largement supérieure à toute concentration d'hydrocarbures susceptible d'être mesurée lors d'un déversement. L'objectif est de provoquer une vaste gamme de réponses de manière à pouvoir calculer une courbe exposition-réponse fiable et des paramètres comme la CL50 ou la CE50. Si on met à l'essai uniquement des concentrations « réalistes », les réponses ne peuvent pas dépasser 50 %, ce qui empêche le calcul statistique d'un paramètre. Bien que les essais de toxicité du pétrole menés dans des conditions « réalistes » puissent appuyer les évaluations des risques propres au site, les données uniques à chaque site peuvent ne pas être comparables entre les laboratoires qui ne réalisent pas l'essai dans les mêmes conditions. Lorsque chaque essai est « unique », comme l'illustre la diversité des méthodes d'essai répertoriées dans le chapitre 4, il n'est pas possible d'appliquer largement les résultats pour parvenir à une compréhension plus générale des dangers et des risques.

L'utilité des essais « réalistes » peut également être remise en question, car il est impossible pour un laboratoire de mettre à l'essai chaque combinaison des conditions rencontrées à différents sites de déversement. Par exemple, le CROSERF visait à élaborer des méthodes d'essai normalisées, tout en offrant des scénarios d'essai qui représentaient des modèles plus réalistes d'un déversement en mer. Les méthodes du CROSERF ont été décrites comme utiles pour comparer les toxicités du pétrole, mais limitées dans leur représentation des scénarios environnementaux du monde réel (Bejarano *et al.* 2014; Coelho *et al.* 2013). Cela est particulièrement le cas dans le cadre de la nouvelle réalité des rejets constants et prolongés de pétrole provoqués par les éruptions de puits dans les grands fonds (déversement de la plateforme Deepwater Horizon en 2010), notamment l'application prolongée d'agents dispersants et la vaste répartition des panaches de pétrole dissous et particulaire en eau profonde (Beyer *et al.* 2016). Ce scénario est particulièrement préoccupant au Canada en

raison de l'exploitation pétrolière et gazière au large de la côte Est. D'autres scénarios émergents, qui ne sont pas bien compris, comprennent les déversements de pétrole et de bitume dilué dans les écosystèmes dulcicoles et de l'Arctique.

Pour résoudre les objectifs contradictoires des essais dans les conditions normales et dans les conditions propres au site, une stratégie consiste à réaliser les deux (Encadré 7). Les comparaisons systématiques de la toxicité dans les conditions normales et non normales peuvent fournir des données sur la toxicité d'un pétrole précis et sur l'importance relative des conditions propres au site pour déterminer le risque relatif de la toxicité. Comme on le voit dans l'encadré 7, il est également possible d'obtenir les données propres au site, comme la toxicité pour différents temps d'exposition, à partir des tests normalisés. Bien que plus coûteuse que des essais uniques, cette approche augmenterait grandement la capacité à appliquer les données d'essai standard aux ÉRÉ et aux ÉIE propres au site et à mieux comprendre les facteurs propres au site qui ont le plus grand effet sur la toxicité.

Encadré 7. Combinaison d'essais normalisés et propres au site

Pour tous les nouveaux pétroles, mettre à l'essai les espèces ou les conditions propres au site :

Appliquer des tests normalisés pour produire les valeurs de référence de la toxicité aiguë et chronique

- Suivre un protocole d'essai standard suffisamment souple pour :
  - L'eau de dilution marine ou douce
  - Les espèces marines ou dulcicoles souvent utilisées dans les essais
  - Les conditions optimisées des essais pour les espèces couramment utilisées dans les essais
- Estimer la toxicité à partir des concentrations mesurées du pétrole dans les solutions d'essai
- Calculer des estimations de la toxicité pour des durées d'exposition propres au site en mesurant fréquemment les réponses pendant une durée d'exposition standard (Sprague 1969)
- Transférer les organismes ayant survécu dans de l'eau douce afin d'observer les effets retardés ou latents
- Générer une perspective en comparant la toxicité aux valeurs documentées pour d'autres pétroles testés dans des conditions normales ainsi qu'à la distribution de la sensibilité des espèces

Effectuer parallèlement des essais propres au site ou « réalistes »

- Appliquer des méthodes normalisées, mais évaluer systématiquement la toxicité propre au site en modifiant une ou plusieurs des conditions d'essai (p. ex., l'altération du pétrole, la salinité, la température, l'intensité de la lumière ultraviolette, l'espèce)
- Estimer la toxicité à partir des concentrations mesurées du pétrole dans les solutions d'essai
- Générer une perspective sur l'importance des conditions propres au site en comparant la toxicité aux résultats des essais normalisés parallèles

5.2 ASPECT PRATIQUE DES MÉTHODES D'ANALYSE

Il n'est pas possible de mettre à l'essai toutes les espèces, tous les régimes/durées d'exposition et toutes les conditions environnementales, et toutes les méthodes d'essai et les mesures ne sont pas pratiques. Il convient de porter une attention particulière au temps, au personnel et aux coûts des paramètres recommandés pour élaborer des protocoles d'essai. Il faut trouver un compromis entre la quantité de renseignements dont les organismes de réglementation ont besoin et la qualité des recherches qui peuvent être menées en fonction des contraintes temporelles et budgétaires. Par conséquent, les recommandations de protocole doivent être souples pour permettre de mettre à l'essai différentes conditions environnementales typiques des déversements propres au site.

Cet examen présente diverses méthodes utilisées pour mesurer la toxicité du pétrole pour le poisson, y compris une vaste gamme d'interprétations des méthodes précédentes. Par exemple, de nombreux documents citent Anderson (1974) et la méthodologie du CROSERF (Aurand et Coelho 2005) comme source de leurs méthodes, mais bon nombre de ces mêmes publications ont adapté les méthodes sans fournir les détails ou les justifications de leurs adaptations. Plusieurs examens suggèrent des modifications à la méthode CROSERF (p. ex., Barron et Ka'aihue 2003; CNR 2005) qui ont par la suite été adoptées dans de nombreuses études, par exemple en vue d'améliorer les données pour les ÉRÉ dans des environnements non tempérés (p. ex., Gardiner *et al.* 2013). Les méthodes différaient également selon que les essais étaient réalisés dans le cadre de recherches ou d'essais réglementaires. George-Ares et Clark (2000), dans leur analyse documentaire, ont attribué la variabilité de la toxicité des agents dispersants au fait que toutes les études n'ont pas été menées à l'appui du processus décisionnel relatif à l'utilisation des dispersants.

Il est souvent difficile de comparer les résultats des essais entre les études, en particulier lorsque des méthodes normalisées ne sont pas appliquées ou lorsque des méthodes susceptibles de changer les résultats des tests de toxicité sont peu documentées. Un thème majeur dans cet examen est la différence importante dans la toxicité aiguë et chronique entre les pétroles altérés et non altérés et entre les pétroles non dispersés et dispersés chimiquement lorsque la toxicité est exprimée comme la dilution de la WAF ou de la CEWAF du pétrole préparée selon différentes méthodes. Sans des méthodes normalisées et sans une description détaillée des méthodes, il est souvent difficile de comprendre la raison de la nature et de la taille de ces différences. Un consensus se fait jour pour dire que bon nombre des différences entre les données sur les essais de toxicité peuvent s'expliquer par les différences dans les concentrations des composantes du pétrole associées à la toxicité aiguë et chronique. Dans les cas où la toxicité est exprimée en fonction de la concentration mesurée d'hydrocarbures, les solutions préparées selon diverses méthodes présentent des toxicités équivalentes. De ce fait, il n'est pas essentiel de suivre une méthode normalisée à la lettre si la méthode est décrite en détail et si elle comprend des mesures du pétrole dans l'eau. De même, les relations exposition-réponse en fonction des concentrations mesurées constituent une base plus fiable pour interpréter les données de la surveillance à la suite des déversements de pétrole ou les concentrations environnementales projetées à partir des modèles pétrole-devenir.

Bien que la chimie analytique environnementale puisse permettre de mieux comprendre la toxicité et les impacts environnementaux, il s'agit d'un facteur limitatif dans la plupart des essais de toxicité. Le nombre d'analyses requises pour caractériser des concentrations stables ou variables dans le temps du pétrole dans l'eau et les coûts des analyses GC-MS ou GC-FID sont souvent prohibitifs. L'élaboration de nouvelles méthodes d'analyse de l'huile (p. ex., méthodes fondées sur la fluorescence), rentables et produisant des résultats étroitement corrélés à ceux des analyses conventionnelles, est un besoin critique en matière de recherche. Dans une étude, toutefois, il est essentiel d'inclure certaines analyses GC-MS ou CG-FID afin de

caractériser la relation entre la méthode de rechange et les méthodes conventionnelles pour les composantes du pétrole visées. Il est également nécessaire de mettre au point un ensemble de substances témoins positives (p. ex., des hydrocarbures pétroliers connus pour leur létalité aiguë) afin de valider des essais de toxicité aiguë des hydrocarbures.

Besoin prioritaire en matière de recherche

- Élaborer un programme visant à déterminer et à diffuser les normes de référence et les huiles de référence.

5.3 CADRE PROPOSÉ

En réponse à ces enjeux, nous avons compilé à l'annexe 1 un cadre proposé des méthodes d'essai recommandées, qui résume les protocoles définis par le CROSERF pour les essais de toxicité du pétrole en milieu marin avec des solutions WAF et CEWAF (Tableau 7) et suggère des modifications pour répondre aux enjeux des essais décrits dans les chapitres 2 à 4. Le résumé distingue les essais de toxicité aiguë et chronique, et est divisé en sections correspondant aux exigences relatives aux éléments suivants :

- Des énoncés explicites des objectifs de l'essai
- La conception expérimentale
- Les essais de toxicité
- La caractérisation physique et chimique du pétrole mis à l'essai
- La caractérisation chimique des solutions d'essai
- La mesure des réponses et le calcul des paramètres
- Des directives sur la présentation des résultats

Pour chaque méthode, les critères présentés devraient être pris en compte lors de la mise à l'essai des produits pétroliers. Néanmoins, les méthodes d'essai doivent être assez souples pour qu'il soit possible de les appliquer aux conditions propres au site ou à des hydrocarbures aux caractéristiques uniques, en particulier si les essais sont appuyés par suffisamment d'analyses chimiques pour comprendre les relations entre l'exposition et les effets communs à toutes les huiles. Bon nombre des recommandations pour les méthodes d'essai indiquées dans le tableau 7 sont inchangées par rapport à la version originale des lignes directrices du CROSERF (Aurand et Coelho 2005). Lorsque des modifications ont été apportées, ou si le centre d'intérêt a changé, ces changements sont indiqués en gras et leur justification est expliquée dans les examens des méthodes du chapitre 4. Ces modifications s'appliquent également à d'autres produits pétroliers aux caractéristiques uniques ou extrêmes, comme le mazout HFO ou le brut léger de Bakken.

Comme il est mentionné à la section 3,1, les exigences des essais de toxicité du pétrole peuvent également entrer en conflit avec les méthodes établies. Par exemple, dans le chapitre 4, il est recommandé d'utiliser des contenants entièrement en verre ou en acier inoxydable afin d'éviter le partage important des hydrocarbures des solutions d'essai dans les enceintes en plastique recommandées actuellement pour les essais de toxicité aux premiers stades biologiques (Environnement Canada 1998). De même, il faut s'écarter de la directive d'Environnement et Changement climatique Canada selon laquelle les analyses chimiques sont facultatives lorsque les techniques analytiques sont limitées, les coûts élevés ou si des renseignements antérieurs sont disponibles (Environnement Canada 1998; 2007; 2011). À moins que la toxicité du pétrole soit exprimée sur une base commune de concentrations mesurées des hydrocarbures, les résultats des essais de toxicité seront trompeurs, ce qui

représente un gaspillage des ressources des essais et des erreurs potentiellement très coûteuses si les données sont utilisées pour des ÉRÉ ou des ÉIE. La section 4.4 présente des outils et des stratégies rentables pour la caractérisation chimique des solutions d'essai.

Tableau 7 : Cadre proposé pour les essais de toxicité du pétrole dispersé physiquement et chimiquement pour les poissons réalisés à l'appui des évaluations réglementaires et des comparaisons de la toxicité entre les huiles, les espèces et les conditions d'essai. WAF fait référence à la fraction d'hydrocarbures adaptée à l'eau, produite par un mélange à énergie faible, moyenne ou élevée d'huile et d'eau, modifiée à partir des méthodes du CROSERF. De même, CEWAF désigne une WAF améliorée chimiquement et produite par un mélange à énergie faible, moyenne ou élevée. Lorsque les méthodes du CROSERF ont été modifiées, ou si le centre d'intérêt a changé, ces changements sont indiqués en gras et leur justification est expliquée dans les examens des méthodes du chapitre 4. Si les propriétés des huiles mises à l'essai (p. ex., la viscosité) risquent d'interagir avec les méthodes d'analyse (p. ex., la dispersion du pétrole) et d'avoir une incidence sur l'efficacité du mélange ou le résultat des essais de toxicité, des expériences préliminaires sont recommandées pour indiquer s'il est nécessaire de modifier les méthodes afin d'éviter un biais. Il est également recommandé de décrire ces changements en détail et de les justifier.

1. Conception expérimentale

Nature de la solution d'essai	Dispersion physique (WAF)	Dispersion chimique (milieu marin, CEWAF)
1.1. Espèce mise à l'essai/ stade biologique	• **Si possible, espèces habituellement mises à l'essai par ECCC, l'EPA ou l'OCDE et stades biologiques ou espèces « modèles » couramment utilisées** • **Si non, justifier**	
1.2. Plage de concentrations	• Englober une plage allant de non toxique à toxique afin de pouvoir calculer les paramètres	
1.3. Temps d'exposition	• Toxicité aiguë — **Suivre le protocole d'essai standard (voir 1.1), généralement 96 h** • Toxicité chronique — **Suivre le protocole d'essai standard (voir 1.1)** • **Si des paramètres sont nécessaires pour des temps d'exposition plus courts (p. ex., CL50 sur 12 h), observer les réponses à des intervalles courts (p. ex., 1, 2, 4, 8 ou 16 h après le début)**	
1.4. Options pour le régime d'exposition	• Régimes d'essai acceptables : non-renouvellement statique (NRS), renouvellement statique (RS) et à flux continu afin de reconnaître les objectifs de l'essai.	
1.5. Type/qualité de l'eau	• **Eau douce à** eau de mer, caractérisée par une analyse chimique • Eau douce : caractériser **le pH, l'alcalinité, la conductivité, la dureté totale, le COT** • Eau salée et eau saumâtre : caractériser **la conductivité ou la salinité, le pH, le COT**	
1.6. État du pétrole	• Pétrole altéré ou non altéré	• Pétrole altéré dispersé ou non altéré

Nature de la solution d'essai	Dispersion physique (WAF)	Dispersion chimique (milieu marin, CEWAF)
1.7. Témoins	• Eau uniquement • **Les témoins positifs sont recommandés, s'il y a lieu** • **Par exemple, pour tester une huile qui ne l'a pas encore été, inclure un pétrole bien connu à titre de substance toxique de référence (p. ex., ANSC, PBCO, MESA)**	• Eau uniquement • **Les témoins positifs sont recommandés, s'il y a lieu** • **Par exemple, pour tester une huile qui ne l'a pas encore été, inclure un pétrole bien connu à titre de substance toxique de référence (p. ex., ANSC, PBCO, MESA)** • **Témoin pour l'agent dispersant (p. ex., CEWAF de Nujol à certains ratios pétrole/eau et dispersant/pétrole, pour tester l'huile)**

2. Préparation des solutions d'essai

Nature de la solution d'essai	Dispersion physique (WAF)	Dispersion chimique (eau de mer, CEWAF)
2.1. Entreposage et manutention du pétrole et des dispersants	• Les stocks frais de pétrole doivent être soigneusement mélangés dans un récipient fermé et entreposés dans des contenants métalliques ou en verre hermétiquement fermés avec un espace de tête minimum. **Consulter les recommandations sur la manutention des hydrocarbures volatils dans la norme ASTM D4057.** • **L'huile doit être caractérisée physiquement et chimiquement au moment de la réception, lors de la première utilisation si elle a été stockée pendant plus d'un mois et à la fin des expériences si elles durent plus d'un mois.** • **Aliquoter le brut frais en volumes nécessaires pour l'utilisation quotidienne, et les entreposer dans des contenants scellés avec un espace de tête minimum à 4 °C; les mélanger à nouveau s'ils sont stockés pendant plus d'un mois.** • **Limiter l'entreposage autant que possible avant les essais et ouvrir les bouteilles aussi peu souvent que possible.** • **Utiliser les mêmes procédures pour les stocks frais de dispersants, mais sans la caractérisation physique ou chimique.**	

Nature de la solution d'essai	Dispersion physique (WAF)	Dispersion chimique (eau de mer, CEWAF)
2.2. Altération du pétrole	• **Les méthodes ASTM D86 ou D2892 peuvent être utilisées pour altérer le pétrole artificiellement, mais il ne faut pas appliquer de températures supérieures à 130 °C afin d'éviter de modifier l'huile chimiquement (y compris par la déshydratation des cycloalcanes et la rupture de liaisons chimiques). Dans les conditions de distillation sous vide (méthode ASTM D1160), la température maximale recommandée est 200 °C.** • **Altérer à un poids constant ou une perte ciblée, sans excéder 48 h.**	
2.3. Eau de dilution	• Utiliser la même source d'eau pour conserver et acclimater les stocks de poissons, pour préparer les solutions WAF/CEWAF et pour préparer les solutions d'essai • **Eau douce : caractériser le pH, l'alcalinité, la conductivité, la dureté totale, le COT.** • Eau salée et eau saumâtre : caractériser **la conductivité ou la salinité, le pH, le COT.** Essais avec de l'eau de mer : • Filtration minimale de 0,45 µm • Il est recommandé d'utiliser de l'eau de mer locale; la diluer avec de l'eau désionisée, au besoin, afin d'atteindre la salinité visée. • L'eau de mer reconstituée est acceptable si elle soutient une bonne survie et une bonne santé des organismes mis à l'essai. Essais avec de l'eau douce : • **Filtration minimale de 0,45 µm si l'eau provient d'une eau de surface non traitée** • **Pour les sources d'eau municipales, traiter jusqu'à ce que le chlore total soit inférieur à 10 µg/l**	
2.4. Dissolution du pétrole dans l'eau	• Lot : Brassage, mélange • **Flux continu : Pompes, colonnes de désorption du pétrole**	• Lot : Brassage, mélange avec les agents dispersants chimiques • **Flux continu : Pompes**
2.5. Ratios pétrole/eau	• **Essais de toxicité aiguë et chronique – 25 g/l ou suffisamment de pétrole pour que les concentrations d'hydrocarbures dans les solutions WAF et CEWAF ne soient pas limitées par la quantité d'huile ajoutée, telle qu'elle est indiquée par le pétrole flottant résiduel après le mélange et par l'analyse chimique des solutions de stock.**	
2.6. Température de mélange	• **Mélanger à la température ambiante (20-22° C)**	
2.7. Luminosité pendant le mélange	• Le mélange doit être effectué dans l'obscurité **ou sous un faible éclairage fluorescent de laboratoire aux UV**	

Nature de la solution d'essai	Dispersion physique (WAF)	Dispersion chimique (eau de mer, CEWAF)
2.8. Ajout du pétrole	• **Ajouter une quantité connue d'hydrocarbures au centre de la surface de l'eau pendant le mélange** • Calculer la masse produite par la différence de poids	
2.9. Taille du récipient de mélange	• **Aucune restriction**	
2.10. Espace de tête	• **Essais de toxicité aiguë — espace de tête de 20 - 25 % dans un récipient de mélange scellé** • **Essais de toxicité chronique — récipient de mélange ouvert**	
2.11. Énergie de mélange	• Lors de l'utilisation d'un barreau d'agitation magnétique, la quantité d'énergie appliquée est jugée uniquement par la profondeur du tourbillon mélangeur. • **Pour les solutions WAF et CEWAF, ajuster le brassage pour obtenir un tourbillon mélangeur équivalant à 20 - 25 % de la profondeur de l'eau (Clark *et al.* 2001).** • **Les méthodes de mélange avec une énergie supérieure et une dispersion chimique peuvent être utiles pour mélanger des hydrocarbures dont la viscosité est plus élevée.** • **Pour les solutions HEWAF et HECEWAF, utiliser un mélangeur à tourbillon et la sonication afin de mélanger complètement l'huile et l'eau.** • Effectuer un essai préalable sur le pétrole afin de déterminer comment il faut ajouter le pétrole et les dispersants à l'eau et si des émulsions de pétrole dans l'eau se forment. Dans ce dernier cas, réduire l'énergie de mélange ou essayer un ratio pétrole/eau différent. • **Lorsqu'ils sont disponibles, utiliser des appareils / protocole standards dont le taux de dissipation de l'énergie est connu.**	
2.12. Durée du mélange	• Devrait être de **18 h pour s'adapter au cycle de 24 h de préparation quotidienne des solutions et éviter les biais dus à la croissance micrcbienne.**	• Le temps de brassage total devrait être de **18 h pour s'adapter au cycle de 24 h de préparation quotidienne des solutions** et éviter les biais dus à la croissance microbienne. **Ajouter l'agent dispersant immédiatement après l'établissement du tourbillon de pétrole**.
2.13. Ratio dispersant/ pétrole	• S.O.	• **1:20**

Nature de la solution d'essai	Dispersion physique (WAF)	Dispersion chimique (eau de mer, CEWAF)
2.14. Ajout du dispersant	• S.O.	• Ajouter une quantité connue de dispersant aux hydrocarbures au centre du tourbillon après l'apparition du tourbillon. • Calculer la masse produite par la différence de poids • Ne pas mélanger le pétrole et le dispersant à l'avance.
2.15. Temps de sédimentation	• **Sédimentation pendant 6 h avant l'extraction de la couche aqueuse pour permettre aux gouttelettes de pétrole de remonter à la surface** • **Utiliser immédiatement — ne pas entreposer avant l'utilisation**	
2.16. Gradients de dilution	• Préparer des gradients avec une dilution variable des solutions de stock WAF ou CEWAF, **en préparant une série de colonnes de désorption du pétrole contenant des gradients de concentrations du pétrole dans le gravier ou à l'aide de dilutions variables d'un flux continu d'eau contaminée par le pétrole produite par les systèmes de pompage et de mélange du pétrole.** • Des dilutions en série d'une solution de stock ne sont pas recommandées en raison d'un biais potentiel dans les proportions relatives d'hydrocarbures de solubilité différente dans l'eau.	
2.17. Entreposage des solutions d'essai	• **Ne pas entreposer les solutions d'essai.**	

3. Essais de toxicité

Nature de la solution d'essai	Dispersion physique (WAF)	Dispersion chimique (eau de mer, CEWAF)
3.1. Espèce mise à l'essai	• Les lignes directrices pour l'élevage et la manipulation des poissons doivent respecter celles publiées par l'un des organismes suivants : ECCC, l'ASTM, l'OCDE, l'EPA, etc., et les protocoles locaux de soin des animaux. • **Lorsque les poissons sont nourris, le renouvellement quotidien de la solution doit suivre immédiatement l'alimentation, de préférence en transférant les poissons dans une solution d'essai fraîche dans un réservoir propre. Il convient de nettoyer à fond l'ancien réservoir afin d'éliminer les débris et les pellicules organiques qui absorbent les hydrocarbures ou qui contiennent des bactéries susceptibles de créer des métabolites des hydrocarbures.** • **Retirer les animaux morts chaque jour pour éviter l'accumulation de demande biologique en oxygène (bactéries) et de matières organiques pouvant absorber les hydrocarbures.**	

Nature de la solution d'essai	Dispersion physique (WAF)	Dispersion chimique (eau de mer, CEWAF)
3.2. Charge en biomasse	• **Suivre le protocole standard pour chaque organisme mis à l'essai**	
3.3. Volume de la solution d'essai et taille du contenant	• **Suivre le protocole standard pour chaque organisme mis à l'essai**	
3.4. Matériaux du récipient d'essai	• **Entièrement en verre (sans joint, c.-à-d. pas d'aquarium avec des plaques de verre assemblées par des joints d'étanchéité en silicone) ou en acier inoxydable** • **Éviter les plastiques, à l'exception du téflon**	
3.5. Aération	• **Toxicité aiguë – Réduire au minimum l'aération des essais de létalité aiguë afin de limiter la volatilisation et l'altération des composés causant une narcose aiguë, mais maintenir une aération suffisante pour soutenir une saturation > 60 % (EPA 850.1075).** • **Toxicité chronique — Faibles taux d'aération suffisants pour maintenir les concentrations d'oxygène dans la plage optimale pour chaque espèce mise à l'essai.**	
3.6. Contenants d'essai	• Toxicité aiguë — Conteneur fermé pour conserver les composés volatils (couvert, mais étanche à l'air) • **Toxicité chronique — Conteneur ouvert**	
3.7. Paramètres	• Létalité (p. ex., CL50 sur 96 h) • « Effet initial » narcose / moribondité (CE50 sur 0,5 à 1 h) • **Toxicité sublé[illegible]CE50; p. ex., toxicité pour les embryons, la croissance, la survie, le comportement, la reproduction, les réactions moléculaires, physiologiques).**	

4. Caractérisation du pétrole

Nature de la solution d'essai	Dispersion physique (WAF)	Dispersion chimique (eau de mer, CEWAF)
4.1. Composition chimique	• **Saturés, aromatiques, résines et asphaltènes (SARA)** • **COV, y compris les BTEX, les hydrocarbures pétroliers totaux (fractions du CCME) (CCME 2001)** • **HAP et HAP totaux (voir la liste des analytes minimaux à l'annexe 2, Tableau A2.2)** • **Dans la mesure du possible, caractériser les hydrocarbures pétroliers par distillation simulée à haute température (p. ex., ASTM D7169)**	

Nature de la solution d'essai	Dispersion physique (WAF)	Dispersion chimique (eau de mer, CEWAF)
4.2. Caractéristiques physiques	• **Viscosité, densité**	
4.3. Entreposage et manipulation	• Entreposer dans des contenants métalliques ou en verre hermétiquement fermés avec un espace de tête minimum • **Ouvrir les contenants aussi peu souvent que possible (voir la section 2.1)** • Entreposer dans l'obscurité à **4 °C** • Caractérisation chimique recommandée du pétrole entreposé afin de surveiller les changements de la composition au fil du temps	

5. Caractérisation des solutions d'essai

Nature de la solution d'essai	Dispersion physique (WAF)	Dispersion chimique (eau de mer, CEWAF)
5.1. Échantillonnage, entreposage et manipulation	• **Prélever les échantillons d'eau pour les analyses d'hydrocarbures dans des solutions de stock WAF et CEWAF fraîches avant les essais de toxicité.** • **Prélever les échantillons d'eau pour les analyses d'hydrocarbures dans chaque solution d'essai au début et à la fin d'un essai de toxicité (de préférence plus souvent) afin de comparer les concentrations mesurées de pétrole aux dilutions nominales.** • **Les concentrations les plus élevées de solutions d'essai doivent être échantillonnées fréquemment (N≥ 3 à intervalles raisonnables tout au long de l'essai) pour décrire les tendances temporelles des concentrations de pétrole et calculer les concentrations moyennes avec une mesure de l'écart.** • **Envisager des regroupements lorsque les volumes de solution d'essai sont limités.** • **Pour les expositions statiques ou à renouvellement quotidien statiques, la concentration la plus élevée doit être échantillonnée de façon répétée sur un cycle 24 heures de renouvellements de la solution afin de décrire le régime de l'exposition variable dans le temps.** • **Si les échantillons sont analysés à l'externe par un laboratoire de pétrochimie qualifié (recommandé), consulter le laboratoire à l'avance au sujet de l'échantillonnage, du regroupement du volume des échantillons, des bouteilles, des agents de préservation, des conditions d'entreposage, du temps d'entreposage, du transport et du choix des normes internes et des normes de récupération.** • **Les échantillons doivent être traités (p. ex., extraits) au laboratoire dans les 14 jours suivant la collecte, et analysés dans les 14 jours suivant le traitement. Les échantillons doivent être conservés à 4 °C pendant le transport et l'entreposage.**	

Nature de la solution d'essai	Dispersion physique (WAF)	Dispersion chimique (eau de mer, CEWAF)
5.2. Hydrocarbures pétroliers totaux ($C_{10} - C_{36}$)	• **Analyser les hydrocarbures pétroliers totaux provenant des fractions du CCME (CCME 2001)** • Ne pas corriger pour tenir compte de la récupération analytique • Limite de détection d'au moins 10 ppm pour les n-alcanes présents dans l'étalon	
5.3. COV, y compris les BTEX ($C_6 < C_{10}$)	• **Voir la liste des analytes cibles minimaux à l'annexe 2, tableau A2.2** • **Les COV doivent être mesurés selon la méthode EPA SW-846**	
5.4. Composés semi-volatils et HAP	• **Voir la liste minimum des HAP, y compris les homologues alkylés, à l'annexe 2, tableau A2.2** • **HAP totaux tels qu'ils sont définis comme la somme des HAP à partir de la liste recommandée** • Ne pas corriger pour tenir compte de la récupération analytique • Limite de détection d'au moins 10 ppm pour les HAP qui figurent dans la norme	
5.5. Analyse rapide de l'huile (p. ex., spectrométries de fluorescence et d'absorption)	• **Les méthodes d'analyses rapides semi-quantitatives peuvent compléter d'autres méthodes d'analyse quantitatives pour les caractérisations répétées des solutions WAF, CEWAF et d'essai, à condition d'analyser un sous-ensemble d'échantillons parallèles par les méthodes quantitatives.** • **Effectuer un étalonnage à l'aide de solutions standards si elles sont disponibles, en utilisant la même matrice que les solutions d'essai.**	

6. Mesure des réponses, calcul des paramètres

Nature de la solution d'essai	Dispersion physique (WAF)	Dispersion chimique (eau de mer, CEWAF)
6.1. Statistiques	• **Doivent inclure une analyse statistique des données, y compris la variabilité (p. ex., les valeurs de CL50 et CE50, notamment les limites de confiance par des tests statistiques appropriés pour des données binomiales ou continues).** • **Exprimer les paramètres en termes d'hydrocarbures pétroliers totaux mesurés et d'HAP totaux mesurés, ou d'autres analytes, s'il y a lieu.**	

7. Lignes directrices pour les rapports : lorsque les méthodes s'écartent de la norme, ces changements doivent être signalés (voir d'autres directives à l'annexe 4).

Nature de la solution d'essai	Dispersion physique (WAF)	Dispersion chimique (eau de mer, CEWAF)
7.1. Objectifs de l'essai	• **Énoncer explicitement les objectifs de l'essai**	

Nature de la solution d'essai	Dispersion physique (WAF)	Dispersion chimique (eau de mer, CEWAF)
7.2. Justification et détails de la conception de l'expérience	• **Expliquer comment la conception de l'expérience répond aux objectifs de l'essai** • **Indiquer tous les témoins et justifier l'inclusion de chacun** • **Fournir des détails sur les plages des concentrations d'essai, le régime d'exposition prévu (p. ex., concentrations constantes ou décroissantes), les réponses mesurées et la taille des échantillons** • **Préciser les hypothèses inhérentes aux méthodes appliquées pour tester la toxicité et caractériser les solutions d'essai, et discuter de l'importance du non-respect de ces hypothèses**	
7.3. Justification et détails des méthodes	• **Décrire toutes les méthodes de préparation des solutions d'essai, les essais de toxicité, les analyses chimiques du pétrole et des solutions d'essai, la manipulation des données et les analyses statistiques** • **Faire référence aux protocoles publiés qui ont été suivis, indiquer tout écart par rapport au protocole publié et fournir une justification pour tout changement** • **Donner suffisamment de détails sur les méthodes d'essai pour qu'un autre laboratoire puisse reproduire l'expérience**	
7.4. Caractéristiques de l'huile mise à l'essai	• **Résultats de la caractérisation physique et chimique du pétrole au moment de la réception, de la mise à l'essai et à la fin de l'essai, en mettant l'accent sur toute perte des composés volatils due à l'altération, les concentrations des composés de faible poids moléculaire (<500) pour les essais de létalité aiguë et les concentrations des hydrocarbures pétroliers totaux et des HAP totaux pour les essais de toxicité chronique** • **Pour les pétroles altérés artificiellement, préciser la température maximale de la méthode utilisée**	
7.5. Caractéristiques des solutions d'essai	• **Décrire la conception de l'échantillonnage** • **Comparer les concentrations mesurées (avec la taille de l'échantillon et une mesure de l'écart) aux concentrations nominales du pétrole** • **Indiquer les autres caractéristiques de la qualité de l'eau, y compris la moyenne (écart, *M*) de la salinité, l'alcalinité, la température, le pH, l'oxygène**	

Nature de la solution d'essai	Dispersion physique (WAF)	Dispersion chimique (eau de mer, CEWAF)
7.6. Variabilité de la concentration de la solution d'essai	• **Concentrations d'hydrocarbures mesurées pendant la durée de l'expérience, y compris les changements des concentrations dans les intervalles entre les renouvellements de la solution pour les protocoles RS. Tracer le graphique du taux de décroissance des concentrations mesurées dans les solutions d'essai sur 24 h et sur la durée totale de l'expérience, avec une mesure de l'écart et de *N*** • **Pour les essais de létalité aiguë à T=0 et à la fin de l'essai, indiquer les mesures des composés volatils et des composés de faible poids moléculaire (<500) pour démontrer l'étendue des pertes dues à l'altération** • **Pour les essais de toxicité chronique, consigner la moyenne (écart, *N*) des concentrations mesurées de pétrole au fil du temps à partir des concentrations la plus élevée, de mi-niveau et témoin** • **Comparer les concentrations mesurées aux dilutions nominales**	
7.7. Caractéristiques des organismes mis à l'essai	• **Origine, âge et stade biologique des organismes mis à l'essai; préciser s'ils proviennent d'une installation d'aquaculture ou d'un élevage à l'interne** • **Fourchette de poids et poids moyen des organismes mis à l'essai et taux de charge de la biomasse dans les solutions d'essai (p. ex., g biomasse/l de solution d'essai)** • **Taux de mortalité de la population du stock dans la semaine précédant l'essai** • **Taux de mortalité dans chaque concentration de pétrole, y compris les témoins, tout au long de l'essai** • **Tout comportement inhabituel ou signe de stress ou de mauvais état de santé**	
7.8. Statistiques	• **Préciser les méthodes statistiques utilisées pour estimer la CL50, la CE50 ou d'autres données sur la toxicité** • **Afficher tous les résultats obtenus à l'aide des concentrations mesurées des hydrocarbures en tant que mesure de l'exposition** • **Inclure la taille de l'échantillon et une mesure de l'écart (de préférence les limites de confiance de 95 %)** • **Noter et justifier toute manipulation des données, y compris l'identification et l'élimination des valeurs aberrantes et le calcul des ratios, et consigner toute possibilité de biais statistique**	

Bien que l'utilisation de méthodes et protocoles normalisés soit fortement recommandée pour les essais de toxicité qui contribueront aux ÉRÉ et aux ÉIE, comme il est indiqué dans le tableau 7, on admet que certains essais auront des objectifs propres au site qui nécessitent de s'écarter de l'éventail des paramètres suggérés par le cadre normalisé. Lorsque l'on s'est écarté de la méthode standard, il est nécessaire de présenter un rapport détaillé sur les paramètres de l'essai et il est recommandé d'effectuer les essais en parallèle selon la méthode standard (voir la section 5.1). En cas d'écart par rapport à la méthode standard pour des évaluations propres au site ou à l'espèce, les paramètres de l'essai peuvent comprendre l'espèce mise à l'essai, le stade biologique, le type et la qualité de l'eau, l'état du pétrole et la température.

5.4 PROCHAINES ÉTAPES : ÉLABORATION D'UNE MÉTHODE NORMALISÉE PAR LA COLLABORATION ENTRE LES SECTEURS

Afin de traduire le cadre proposé pour les essais de toxicité du pétrole en une ou plusieurs méthodes normalisées, il est recommandé d'élaborer un processus fondé sur le consensus entre des scientifiques de l'industrie, du gouvernement et du milieu universitaire, semblable à l'initiative du CROSERF. Une telle élaboration viendrait compléter les initiatives antérieures du groupe de l'élaboration de méthodes biologiques d'Environnement et Changement climatique Canada (ECCC). L'un des aspects clés de l'initiative du CROSERF était la capacité de rassembler l'industrie, le milieu universitaire et le gouvernement afin de faciliter une discussion ouverte et de former des collaborations. Les différentes parties ont discuté de leurs préoccupations entourant les méthodes d'analyse, ce qui leur a permis de mieux faire accepter les normes produites, tout en élargissant l'applicabilité des méthodes mises au point. De plus, la collaboration a réduit le coût et le nombre des études de confirmation externe, et a amélioré la comparabilité entre les études. Lorsque des méthodes sont largement acceptées, les scientifiques passent plus de temps à discuter des conséquences de la toxicité mesurée que de l'incidence des méthodes d'essai sur la toxicité mesurée. L'objectif final consiste à élaborer une méthode standard pour évaluer la toxicité du pétrole, dans laquelle les données générées sont comparables pour appuyer la prise de décisions.

6 RECOMMANDATIONS DE RECHERCHE

L'examen approfondi des effets des déversements de pétrole par la Société royale du Canada (Lee *et al.* 2015) a permis de cerner les besoins en matière de recherche concernant la compréhension du devenir, du comportement et des effets des hydrocarbures dans les écosystèmes aquatiques du Canada, en particulier dans les eaux douces et les eaux de l'Arctique. Dans son examen, la SRC définit des besoins en matière de recherche sur le bitume dilué en tant que produit pétrolier unique, tout comme l'avait fait la National Academy of Sciences (NAS 2016). Dew *et al.* (2015) ont cerné des lacunes dans les connaissances sur les déversements de bitume dilué dans l'eau douce : devenir, classement de la sensibilité des espèces à la toxicité, effets des facteurs environnementaux sur la toxicité et mécanismes de la toxicité. Dans la présente analyse documentaire, les besoins en matière de recherche sont limités à des méthodes pour les essais de toxicité du pétrole et l'évaluation des facteurs qui ont une incidence sur les résultats des essais de toxicité, en particulier avec le bitume dilué. Ces besoins ont été regroupés à partir du présent document et des examens cités précédemment. Certains des besoins de recherche définis ci-après font actuellement l'objet de recherches.

Liste des besoins prioritaires en matière de recherche :

- Évaluer l'effet de tous les aspects de la préparation des solutions (p. ex., l'espace de tête dans le récipient de mélange; le ratio pétrole/eau; le volume d'essai) sur la composition chimique, les concentrations et la toxicité des solutions WAF et CEWAF.
- Élaborer une méthode pratique et de routine (ou un système) pour déterminer l'énergie de mélange pendant la préparation des solutions par brassage, sonication, mélange à énergie élevée, etc.
- Réaliser une étude documentaire pour démontrer la gamme des énergies de mélange associées aux déversements dans des océans, sur des côtes, dans des lacs et dans des rivières où les courants et la turbulence sont différents.
- Élaborer un programme visant à déterminer et à diffuser les normes de référence et les huiles de référence.
- Élaborer des méthodes d'analyse rapides et peu coûteuses afin de caractériser chimiquement le pétrole et les solutions d'essai (y compris les analyses SARA et les techniques de distillation à haute température).

Préparation des solutions d'essai

- Évaluer les interactions entre le pétrole dissous et particulaire (dispersé physiquement et chimiquement) et les matières organiques particulaires, et leurs effets sur la toxicité mesurée du pétrole.
- Élaborer des méthodes peu coûteuses et pratiques pour mesurer la concentration et la distribution par taille des gouttelettes d'hydrocarbures dans les solutions d'essai pour distinguer le pétrole dissous du pétrole particulaire.
- Examiner l'effet de la température de mélange sur la composition chimique, la concentration et la toxicité des solutions WAF et CEWAF.
- Déterminer les facteurs expérimentaux qui ont une incidence sur la composition et la toxicité des solutions d'essai préparées avec des colonnes de désorption du pétrole, des pompes à haute pression et des mélangeurs.
- Évaluer la durée de mélange nécessaire pour que des bitumes dilués aux formules différentes et dans différents états d'altération atteignent l'équilibre fonctionnel entre les phases aqueuse et huileuse, particulièrement à travers toute une gamme de températures.

Rendement et détails sur les expériences connexes

- Élaborer des objectifs de qualité des données pour évaluer la fiabilité des analyses chimiques des hydrocarbures et des solutions d'essai et pour comparer les résultats et le rendement entre plusieurs laboratoires.
- Effectuer des essais interlaboratoires de toxicité sur des échantillons partagés de bitume dilué et de pétrole brut afin d'estimer l'écart dans les résultats des essais qui devrait être intégré à titre d'incertitude dans les ÉRÉ et les ÉIE, et de déterminer les variables d'essai qui contribuent le plus fortement à l'écart entre les laboratoires.
- Pour le cadre d'essai proposé, mettre à l'essai les hypothèses inhérentes aux essais de toxicité aquatique des hydrocarbures afin de déterminer celles qui sont respectées et celles qui ne le sont pas.

Détails sur l'exposition

- Optimiser l'application des échantillonneurs passifs pour caractériser les concentrations d'hydrocarbures dissous dans les solutions d'essai.

- Évaluer la photosensibilisation des produits du bitume dilué dans les essais en laboratoire et dans l'éventail des intensités des UV typiques des environnements canadiens.
- Élaborer des méthodes pratiques pour mesurer « l'adhérence » des huiles.
- Élaborer des modèles statistiques qui intègrent les concentrations d'hydrocarbures dans les solutions d'essai au fil du temps afin de générer un paramètre stable de l'exposition et de la toxicité calculée.
- Déterminer et évaluer des protocoles d'essai pratiques et rentables pour maintenir les concentrations d'hydrocarbures constantes dans les solutions d'essai pendant la durée des essais de toxicité.
- Afin de déterminer les récipients d'essai de toxicité les mieux adaptés, évaluer l'absorption du pétrole des solutions d'essai pour divers matériaux de réservoir ainsi que l'étendue, la chronologie et la nature des changements dans la composition chimique des solutions d'essai.

Bitume dilué et autres produits pétroliers

- Caractériser la nature et la portée des changements physiques et chimiques afin de mettre les huiles à l'essai dans différentes conditions de stockage, et les effets potentiels sur le résultat des essais de toxicité.
- Comparer le comportement et la toxicité du bitume dilué dans l'eau de mer, l'eau saumâtre et l'eau douce, y compris dans les eaux riches en acides humiques ou à très faible alcalinité (ainsi que selon la dureté totale, le pH et d'autres paramètres) et dans des conditions tempérées et arctiques.
- Déterminer les effets sur la toxicité du pétrole des variations des principaux paramètres de la qualité de l'eau (p. ex., pH, alcalinité, salinité, COD, COP, acides humiques).
- Comparer la toxicité du bitume dilué à celle de pétroles bruts classiques déjà testés, en utilisant les mêmes méthodes normalisées pour préparer les solutions d'essai et mesurer la toxicité.
- Élaborer des méthodes normalisées pour évaluer la toxicité du bitume dilué incorporé dans les sédiments.
- Appliquer le fractionnement chimique axé sur les effets (FCAE) afin de déterminer les composantes toxiques du pétrole.
- Élaborer des distributions de la sensibilité des espèces en fonction des essais normalisés de toxicité du pétrole.
- Évaluer les contributions à la toxicité des produits issus de la photodégradation et de la biodégradation des hydrocarbures, y compris des matières organiques extractibles à l'acide.
- Répéter les essais de toxicité avec divers produits du bitume dilué et différentes espèces d'essai typiques des milieux canadiens, selon des conceptions expérimentales conformes aux méthodes normalisées.

Altération du pétrole

- Mettre à l'essai des pétroles bruts légers et lourds à plusieurs états d'altération afin de déterminer la façon dont la composition chimique et la toxicité des solutions d'essai changent avec les durées et les températures de mélange à différents moments au cours de l'essai.
- Évaluer les effets de l'altération du pétrole pendant la préparation des solutions sur la densité (gravité API) et la viscosité des huiles mises à l'essai, sur la composition chimique

des solutions d'essai préparées selon des méthodes normalisées, et sur la toxicité mesurée du pétrole.

- Évaluer les effets de la préparation des échantillons sur l'altération du bitume dilué pendant les essais de toxicité, et élaborer des procédures pour préparer les échantillons de bitume dilué qui réduisent l'altération.

Agents de traitement des déversements

- Déterminer les ratios dispersant-pétrole et les méthodes d'ajout du dispersant au pétrole qui sont optimaux pour réduire au minimum le dispersant « libre » dans les solutions d'essai, pour maximiser la quantité de pétrole dissous et particulaire dans la solution et pour réduire au minimum la toxicité du dispersant dans les essais de toxicité de pétrole dispersé. Pour les évaluations des risques, il peut être nécessaire de tester différents ratios pour correspondre aux conditions propres au site ou aux règlements applicables.
- Évaluer différents témoins pour les essais de pétrole chimiquement dispersé afin de déterminer si oui ou non l'agent dispersant a une incidence sur le résultat des essais de toxicité, et s'il existe une toxicité interactive pétrole-dispersant.
- Évaluer l'efficacité de la dispersion chimique du bitume dilué altéré et non altéré selon les spectres de taille des gouttelettes produites, la composition chimique des solutions d'essai et la toxicité mesurée.
- Évaluer les effets chroniques et sublétaux des agents dispersants chimiques sur les poissons, à la fois individuellement et en combinaison avec des hydrocarbures.
- Élaborer des méthodes pour caractériser l'agent dispersant « libre » dans les solutions d'essai et les agents dispersants associés aux particules de pétrole.

7 CONCLUSIONS

Cette analyse documentaire des méthodes permettant de mesurer la toxicité du pétrole pour les poissons a démontré la nécessité d'élaborer d'autres méthodes d'essai normalisées à l'appui des ÉRÉ et des ÉIE. La documentation est caractérisée par une grande diversité de méthodes d'essai, d'huiles mises à l'essai et de conditions d'essai, dont la plupart n'ont pas été examinées de façon systématique afin de démontrer leur incidence sur la toxicité estimée. Un trop grand nombre de rapports fournissent trop peu de détails sur les huiles mises à l'essai et les conditions d'essai pour qu'il soit possible de pleinement interpréter les données de l'essai. De ce fait, les comparaisons de la toxicité entre les pétroles, entre les espèces mises à l'essai et entre les conditions d'essai sont compliquées et les données sont souvent inappropriées pour les ÉRÉ et les ÉIE propres au site.

Ces points sont particulièrement importants pour les produits du bitume dilué, qui ont des propriétés uniques par rapport aux pétroles bruts classiques, y compris une altération rapide, la prédominance d'hydrocarbures de poids moléculaire plus élevé comme les HAP, et une plus grande adhérence. Ces propriétés uniques exercent une forte influence sur le comportement et la chimie du bitume dilué pendant les essais et sur sa toxicité perçue. Le même serait également vrai pour les pétroles ultra légers typiques de la fracturation hydraulique et pour les pétroles lourds qui vont devenir prédominants à mesure que les réserves de bruts classiques diminuent. *À la lumière de cette analyse documentaire, les expériences testant des produits pétroliers inhabituels ou nouveaux devraient procéder à des essais préliminaires afin de déterminer comment les propriétés de ces huiles influencent leurs caractéristiques de mélange et leur transfert dans l'eau. En fonction de ces expériences, de légères modifications aux protocoles courants pourraient résoudre les problèmes et devraient être décrites de manière détaillée.*

Dans l'ensemble, cette analyse documentaire pourrait donner la fausse impression que toutes les données des essais de toxicité manquent de fiabilité. Toutefois, il n'en est rien : une grande partie des études examinées constituent de bons travaux scientifiques, mais les conditions propres au site de ces essais ont limité leur applicabilité aux ÉRÉ et aux ÉIE de déversements de pétrole dans différentes circonstances. Les données peuvent être utiles, mais le jugement d'experts est nécessaire pour comprendre comment la toxicité indiquée peut changer en fonction des circonstances. Il faut également reconnaître que les essais de toxicité dans lesquels les concentrations d'hydrocarbures décroissent dans le temps, et les analyses chimiques des solutions d'essai qui ne distinguent pas les hydrocarbures dissous et particulaires, sous-estiment probablement la toxicité réelle du pétrole dissous dans l'eau et contribuent à l'incertitude des risques estimés.

Pour tenter d'atténuer ces problèmes à l'aide de méthodes d'essai normalisées (CROSERF), on a spécifié : les analyses visant à caractériser les pétroles mis à l'essai et les solutions d'essai; les protocoles pour la préparation des solutions WAF et CEWAF, pour l'exposition des organismes aquatiques aux solutions de pétrole pendant 96 heures et pour la mesure des réponses; et les exigences de déclaration détaillée des conditions des essais et des données sur la toxicité. Cependant, la méthode du CROSERF reposait sur un scénario de déversement d'hydrocarbures typique du naufrage d'un navire en eaux libres, avec une dissipation rapide des concentrations d'hydrocarbures dans les eaux superficielles et une mesure de la létalité aiguë (<96) alors que les concentrations diminuaient. Les scénarios de rejets constants en eaux profondes pendant des périodes prolongées (p. ex., le déversement de Deepwater Horizon dans le golfe du Mexique en 2010), de déversements dans des rivières et lacs d'eau douce confinés (p. ex., déversement dans le lac Wabamun en 2005; déversement dans la rivière Kalamazoo en 2010) et d'exposition et de toxicité chroniques n'ont pas été pris en compte.

L'alternative à l'approche propre au site est d'élaborer des méthodes plus génériques qui produisent des données sur la toxicité qui reflètent principalement la composition chimique de l'huile mise à l'essai et non ses caractéristiques physiques ou les conditions uniques de l'essai qui modifient l'ampleur de l'exposition des organismes aquatiques au pétrole. Une méthode standard devrait générer des données sur la toxicité qui peuvent être comparées entre les huiles de types très différents et un classement des risques relatifs parmi les huiles en fonction de leur chimie. L'application, pour les ÉRÉ et les ÉIE, de données normalisées sur les conditions de déversement propres au site utiliserait des modèles de devenir et de comportement des hydrocarbures pour prédire l'étendue de l'exposition des espèces aquatiques aux constituants précis du pétrole, et par conséquent la toxicité. Des renseignements plus détaillés pour valider les prédictions des modèles pourraient être tirés d'études comparant l'effet de différentes conditions environnementales sur le devenir, le comportement et la toxicité d'hydrocarbures courants, ou de la comparaison des essais dans les conditions propres au site aux essais réalisés dans des conditions normalisées pour fournir une référence.

Cette analyse présente un cadre proposé pour les tests normalisés qui énumère les exigences détaillées de la méthode du CROSERF, modifiée à l'aide des recommandations concernant l'amélioration de la définition des objectifs des essais, des conceptions expérimentales, des méthodes de préparation des solutions d'essai de pétrole dispersé physiquement et chimiquement, des analyses chimiques pour caractériser les solutions d'essai, des régimes d'exposition pour les essais de toxicité aiguë et chronique, ainsi que des méthodes statistiques et des exigences de déclaration pour les conditions et les résultats des essais. Il ne s'agit pas d'une méthode normalisée, mais plutôt d'un cadre souple pour orienter les futurs tests de toxicité du pétrole, cerner les besoins en matière de recherche en vue d'améliorer les méthodes d'analyse et stimuler l'élaboration de méthodes pour différents aspects des essais de toxicité

normalisés. L'un des aspects les plus utiles du processus du CROSERF était la collaboration entre des scientifiques du gouvernement, des universités et de l'industrie afin d'élaborer des recommandations fondées sur le consensus pour les méthodes d'essai, et il est recommandé d'adopter cette approche de manière à exploiter les résultats de cet examen.

8 RÉFÉRENCES

Adams, J., Bornstein, J.M., Munno, K., Hollebone, B., King, R.T., Brown, S., and Hodson, P.V. 2014a. Identification of compounds in heavy fuel oil that are chronically toxic to rainbow trout embryos by effects-driven chemical fractionation. Environ. Toxicol. Chem. 33: 825–835.

Adams, J., Sweezey, M., and Hodson, P.V. 2014b. Oil and oil dispersant do not cause synergistic toxicity to fish embryos. Environ. Toxicol. Chem. 33: 107–114.

Adeyemo, O.K., Kroll, K.J., and Denslow, N.D. 2015. Developmental abnormalities and differential expression of genes induced in oil and dispersant exposed *Menidia beryllina* embryos. Aqua. Toxicol. 168: 60–71.

Agamy, E. 2013. Impact of laboratory exposure to light Arabian crude oil, dispersed oil and dispersant on the gills of the juvenile brown spotted grouper (*Epinephelus chlorostigma*): A histopathological study. Mar. Environ. Res. 86: 46–55.

Akaishi, F.M., Silva de Assis, H.C., Jakobi, S.C.G., Eiras-Stofella, D.R., St-Jean, S.D., Courtenay, S.C., Lima, E.F., Wagener, A.L.R., Scofield, A.L., and Oliveira Ribeiro, C.A. 2004. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. Arch. Environ. Con. Tox. 46: 244–253.

Alderman, S.L., Lin, F., Farrell, A.P., Kennedy, C.J., and Gillis, T.E. 2016. Effects of diluted bitumen exposure on juvenile sockeye salmon: From cells to performance. Environ. Toxicol. Chem. doi: 10.1002/etc.3533.

Alloy, M., Baxter, D., Stieglitz, J., Mager, E., Hoenig, R., Benetti, D., Grosell, M., Oris, J., and Roberts, A. 2016. Ultraviolet Radiation Enhances the Toxicity of Deepwater Horizon Oil to Mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) Embryos. Environ. Sci. Technol. 50(4): 2011–2017.

Anderson, J.W., Neff, J.M., Cox, B.A., Tatem, H.E., and Hightower, G.M. 1974. Characteristics of dispersions and water-soluble extracts of crude and refined oils and their toxicity to estuarine crustaceans and fish. Mar. Biol. 27: 75–88.

ASTM. 2014. Standard Guide for the Use of Lighting in Laboratory Testing, E1733-95, p. 1279–1289, in: 1996 Annual Book of ASTM Standards, Vol. 11.05, *In* American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA (1996).

Aurand, D. and Coelho, G. 2005. Cooperative aquatic toxicity testing of dispersed oil and the Chemical Response to Oil Spills: Ecological Effects Research Forum (CROSERF). Ecosystem Management & Associates, Inc. Technical Report. 105 p.

Austad, T., Shariatpanahi, S.F., Strand, S., Black, C.J.J., and Webb, K.J. 2011. Conditions for a low-salinity enhanced oil recovery (EOR) effect in carbonate oil reservoirs. Energ. Fuel. 26: 569–575.

Bakker, G. 2011. The corrosive nature of diluted bitumen and crude oil literature review. M.R. Gordon and Associates Ltd. 16 p.

Barron, M.G. and Ka'aihue, L. 2001. Potential for photoenhanced toxicity of spilled oil in Prince William Sound and Gulf of Alaska waters. Mar. Pollut. Bull. 43: 86–92.

Barron, M.G. and Ka'aihue, L. 2003. Critical evaluation of CROSERF test methods for oil dispersant toxicity testing under subarctic conditions. Mar. Pollut. Bull. 46: 1191–1199.

Barron, M.G., Carls, M.G., Short, J.W., and Rice, S.D. 2003. Photoenhanced toxicity of aqueous phase and chemically dispersed weathered Alaska North Slope crude oil to Pacific herring eggs and larvae. Environ. Toxicol. Chem. 22: 650–660.

Barron, M.G., Carls, M.G., Short, J.W., Rice, S.D., Heintz, R.A., Rau, M., and Di Giulio, R. 2005. Assessment of the Phototoxicity of Weathered Alaska North Slope Crude Oil to Juvenile Pink Salmon. Chemosphere. 60: 105–110.

Bauder, M.B., Palace, V.P., and Hodson, P.V. 2005. Is Oxidative Stress the Mechanism of Blue Sac Disease in Retene-Exposed Trout Larvae? Environ. Toxicol. Chem. 24: 694–702.

Bejarano, A.C., Levine, E., and Mearns, A.J. 2013. Effectiveness and potential ecological effects of offshore surface dispersant use during the Deepwater Horizon Oil Spill: A retrospective analysis of monitoring data. Environ. Monit. Assess. 185: 10281–10295.

Bejarano, A.C., Clark, J.R., and Coelho, G.M. 2014. Issues and challenges with oil toxicity data and implications for their use in decision making: A quantitative review. Environ. Toxicol. Chem. 33: 732–742.

Bennett, D., Girling, A.E., and Bounds, A. 1990. Ecotoxicology of Oil Products: Preparation and Characterisation of Aqueous Test Media. Chemosphere. 21: 659–669.

Beyer, J., Trannum, H.C., Bakke, T., Hodson, P.V., and Collier, T. 2016. Environmental effects of the Deepwater Horizon oil spill: a review. Marine Poll. Bull. 110: 28–51.

Bidwell, J.R., Cherry, D.S., and Merski, A.T. 2003. Toxicity evaluation of a commercial bioremediation agent mixed with crude oil. Environ. Toxicol. Chem. 22: 84–91.

Binder, R.L. and J.J. Stegeman. 1983. Basal levels and induction of hepatic aryl hydrocarbon hydroxylase activity during the embryonic period of development in brook trout. Biochem. Pharmacol. 32: 1324–1327.

Blondina, G.J., Singer, M.M., Lee, I., Ouano, M.T., Hodgins, M., Tjeerdema, R.S., and Sowby, M.L. 1999. Influence of salinity on petroleum accommodation by dispersants. Spill. Sci. and Technol. Bull. 5: 127–134.

Bornstein, J.M., Adams, J.E., Hollebone, B., King, T., Hodson, P.V., and Brown, R.S. 2014. Effects-driven chemical fractionation of heavy fuel oil to isolate compounds toxic to trout embryos. Environ. Toxicol. Chem 33: 814–824.

Bragin, G.E., Parkerton, T.F., Redman, A.D., Letinksi, D.J., Butler, J.D., Paumen, M.L., Sutherland, C.S., Knarr, T.M., Comber, M., and den Haan, K. 2016. Chronic toxicity of selected polycyclic aromatic hydrocarbons to algae and crustaceans using passive dosing. Environ. Toxicol. Chem. 9999: 1–10.

Brooks, M. 2014. The Cautionary Tale of Kalamazoo: The still-unfolding horrors of spilled bitumen in Mic<higan's Kalamazoo River explain why more pipelines are an unacceptable risk. Alt. J. 40: 18–25.

Brooks, P.W., Fowler, M.G., and Macqueen, R.W. 1988. Biological marker and conventional organic geochemistry of oil sands/heavy oils, Western Canada Basin. Org. Geochem. 12: 519–538.

Camus, L., Aas, E., and Børseth, J.F. 1998. Ethoxyresorufin-O-deethylase activity and fixed wavelength fluorescence detection of PAHs metabolites in bile in turbot (*Scophthalmus maximus L.*) exposed to a dispersed topped crude oil in a continuous flow system. Mar. Environ. Res. 46(1): 29–32.

Canevari, G.P., Calcavecchio, P., Becker, K.W., Lessard, R.R., and Fiocco, R.J. 2001. Key parameters affecting the dispersion of viscous oil. *In* International Oil Spill Conference pp. 479–484.

Carls, M.G., Rice, S.D., and Hose, J.E. 1999. Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part I. low level exposure during incubation causes malformations, genetic damage, and mortality in larval Pacific herring (*Clupea pallasi*). Environ. Toxicol. Chem. 18: 481–493.

Carls, M.G. and Thedinga, J.F. 2010. Exposure of pink salmon embryos to dissolved polynuclear aromatic hydrocarbons delays development, prolonging vulnerability to mechanical damage. Mar. Environ. Res. 69: 318–325.

Carlsson, G., Norrgren, L., Hylland, K., and Tollefsen, K.E. 2014. Toxicity screening of produced water extracts in a zebrafish embryo assay. J. Tox. Env. Health A. 77: 600–615.

CBC. 2016a. Expect oil along shores of North Saskatchewan River, says spill expert. Curves of the river will send oil to shore areas, expert says. (accessed August 2, 2016).

CBC. 2016b. Natural recovery part of Husky oil spill response, expert says. (accessed August 2, 2016).

CCME. 2001. Méthode de référence pour le standard pancanadien relatif aux hydrocarbures pétroliers dans le sol – méthode du 1er volet., Le Conseil canadien des ministres de l'environnement, Winnipeg, MN.

Chandrasekar, S., Sorial, G.A., and Weaver, J.W. 2006. Dispersant effectiveness on oil spills - impact of salinity. ICES J. Mar. Sci. 63: 1418–30.

Chapman, H., Purnell, K., Law, R.J., and Kirby, M.F. 2007. The use of chemical dispersants to combat oil spills at sea: A review of practice and research needs in Europe. Mar. Poll. Bull. 54: 827–838.

Choyke, S and Ferguson, P.L. 2015. Analysis of Corexit 9500 dispersant biodegradation in seawater using high resolution mass spectrometry. SETAC, Salt Lake City.

Clark, J., Becker, K., Venosa, A., and Lewis, A. 2005. Assessing dispersant effectiveness for heavy fuel oils using small-scale laboratory tests. *In* International Oil Spill Conference Proceedings: 59–63.

Clark, J.R., Bragin, G.E., Febbo, E.J., and Letinski, D.J. 2001. Toxicity of physically and chemically dispersed oils under continuous and environmentally realistic exposure conditions : Applicability to dispersant use decisions in spill response planning. *In* International Oil Spill Conference Proceedings: 1249–55.

Clayton, J.R., Payne, J.R., Farlow, J.S. (ed.). 1992. Oil spill dispersants mechanisms of action and laboratory tests. CK Smoley, Boca Raton, Florida, U.S.A. 88 p.

Coelho, G., Clark, J., and Aurand, D. 2013. Toxicity testing of dispersed oil requires adherence to standardized protocols to assess potential real world effects. Environ. Pollut. 177: 185–188.

CONCAWE. 1993. Ecotoxicological testing of petroleum products: Test methodology report No. 92/56. 22 p.

Cooney, J.D. 1995. Chapter 2, Freshwater tests. In: *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment*. 2nd edition. Edited by Gary M. Rand. Washington DC, Taylor & Francis. 71–102.

Cotter, J. 2016. Husky Energy changes day it discovered Saskatchewan oil pipeline spill. (accessed July 30, 2016).

Couillard, C.M., Lee, K., Légaré, B., and King, T.L. 2005. Effect of dispersant on the composition of the water accommodated fraction of crude oil and its toxicity to larval marine fish. Environ. Toxicol. Chem. 24(6): 1496–1504.

Croce, B. and Stagg, R.M. 1997. Exposure of Atlantic salmon parr (*Salmo salar*) to a combination of resin acids and a water soluble fraction of diesel fuel oil: A model to investigate the chemical causes of pigmented salmon syndrome. Environ. Toxicol. Chem. 16: 1921–1929.

Daaou, M. and Bendedouch, D. 2012. Water pH and surfactant addition effects on the stability of an Algerian crude oil emulsion. J. Saudi. Chem. Soc. 16: 333–337.

da Cruz, A.C.S., Leite, M.B.N., Rodrigues, L.E.A, and Nascimento, I.A. 2012. Estimation of biodiesel cytotoxicity by using acid phosphatase as a biomarker of lysosomal integrity. B. Environ. Contam. Tox. 89(2): 219–224.

Danion, M., Le Floch, S., Kanan, R., Lamour, F., and Quentel, C. 2011. Effects of in vivo chronic hydrocarbons pollution on sanitary status and immune system in sea bass (*Dicentarchus labrax* L.). Aquat. Toxicol. 105: 300–311.

Davis, J.C. 1977. Standardization and protocols of bioassays - Their role and significance for monitoring, research and regulatory useage (EPS-5-AR-77-1). *In* 3rd Aquatic Toxicity Workshop: 1–14.

Davison, W., Franklin, C.E., Mckenzie, J.C., and Dougan, M.C. 1992. The effects of acute exposure to the water soluble fraction of diesel fuel oil on survival and metabolic rate of an Antarctic fish (*Pagothenia borchgrevinki*). Comp. Biochem. Phys C. 102(1): 185–188.

Dew, W.A., Hontela, A., Rood, S.B., Pyle, G.G. 2015. Biological effects and toxicity of diluted bitumen (dilbit) and its constituents in freshwater systems. J. App. Toxicol. 35: 1219–1227.

Dietrich, D.E., Bowman, M.J., Korotenko, K.A., Hamish, M., and Bowman, E. 2014. Oil Spill Risk Management: Modeling Gulf of Mexico circulation and oil dispersal. Scrivener Publishing, Salem, Massachusetts.

Doe, K.G. and Wells, P.G. 1978. Acute aquatic toxicity and dispersing effectiveness of oil spill dispersants: Results of a Canadian Oil Dispersant Testing Program (1973 to 1977). In Chemical Dispersants for the Control of Oil Spills, ASTM STP 659: 50–65.

Doudoroff, P., Anderson, B.G., Burdick, G.E., Galtsoff, P.S., Hart, W.B., Patrick, R., Strong, E.R., and van Horn, W.M. 1951. Bioassay methods for the evaluation of acute toxicity of industrial wastes to fish. Sew. Ind. Waste. 23: 1380–1397.

Echols, B.S., Smith, A.J., Gardinali, P.R., and Rand, G.M. 2016a. The use of ephyrae of a scyphozoan jellyfish, *Aurelia aurita*, in the aquatic toxicological assessment of Macondo oils from the Deepwater Horizon incident. Chemosphere. 144: 1893–1900.

Echols, S.B., Smith, A., Gardinali, P., and Rand, G. 2016b. An evaluation of select test variables potentially affecting acute oil toxicity. Arch. Environ. Con. Toxicol. 70: 392–405.

Enbridge Energy. 2013. Enbridge Line 6B MP 608. Marshall, MI pipeline release. Supplement to the response plan for downstream impacted areas commonly referred to as the "Quantification of Submerged Oil Report". Resubmitted version March 21, 2013. Prepared for the United States Environmental Protection Agency. 171 p.

ENG, 2011. Enbridge Northern Gateway, 2011, Northern Gateway Response to Federal Government IR No.1, ENG JRP Exhibit #B41-4, 246 p.

Environnement Canada (EC). 1998. Méthode d'essai biologique : essais toxicologiques sur des truites arc-en-ciel aux premiers stades de leur cycle biologique EPS1/RM/28 Deuxième édition. Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Centre de technologie environnementale Environnement Canada, Ottawa, ON.

Environnement Canada (EC). 2007. Méthode d'essai biologique : essai de létalité aiguë sur la truite arc-en-ciel EPS1/RM/09. Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Centre de technologie environnementale, Environnement Canada, Ottawa, ON.

Environnement Canada (EC). 2011. Méthode d'essai biologique - essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule EPS1/RM/22 Deuxième édition. Section de l'élaboration et de l'application des méthodes, Centre de technologie environnementale, Environnement Canada, Ottawa, ON.

Environnement Canada (EC). 2016. Propriétés d'hydrocarbures. Centre de Technologie Environnementale.

Ernst, V.V., Neff, J.M., and Anderson, J.W. 1977. The effects of the water-soluble fractions of No. 2 fuel oil on the early development of the estuarine fish, *Fundulus grandis* Baird and Girard. Environ. Pollut. 14(1): 25–35.

Faksness, L.G., Brandvik, P.J., and Sydnes, L.K. 2008. Composition of the water accommodated fractions as a function of exposure times and temperatures. Mar. Pollut. Bull. 56: 1746–1754.

Federal On Scene Coordinator (FOSC). 2016. Desk Report for the Enbridge Line 6B Oil Spill Marshall, Michigan. April 2016. 241 p.

Fingas, M., Bier, I., Bobra, M., and Callaghan, S. 1991. Studies on the physical and chemical behavior of oil and dispersant mixtures. *In* International Oil Spill Conference Proceedings, 1: 419–426.

Forth, H.P., Mitchelmore, C.L., Morris, J.M., and Lipton, J. 2016. Characterization of oil and water accommodated fractions used to conduct aquatic toxicity testing in support of the Deepwater Horizon Oil Spill Natural Resource Damage Assessment. *Environ Toxicol Chem.* doi.org/10.1002/etc.3672.

Fragoso, N.M., Parrott, J.L., Hahn, M.E., and Hodson, P.V. 1998. Chronic Retene Exposure Causes Sustained Induction of Cyp1a Activity and Protein in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*). Environ. Toxicol. Chem. 17: 2347–53.

Freeman, L. 1953. A Standardized Method for Determining Toxicity of Pure Compounds to Fish. Sew. Ind. Waste. 25: 845–848.

Fucik, K.W., Carr, K.A., & Balcom, B.J. 1995. Toxicity of oil and dispersed oil to the eggs and larvae of seven marine fish and invertebrates from the Gulf of Mexico. In *The Use of Chemicals in Oil Spill Response*. ASTM International.

Gardiner, W.W., Word, J.Q., Word, J.D., Perkins, R.A., McFarlin, K.M., Hester, B.W., Word, L.S., and Ray, C.M. 2013. The acute toxicity of chemically and physically dispersed crude oil to key Arctic species under Arctic conditions during the open water season. Environ. Toxicol. Chem. 32(10): 2284–2300.

George-Ares, A., Clark, J.R., Biddinger, G.R., and Hinman, M.L. 1999. Comparison of test methods and early toxicity characterization for five dispersants. Ecotox. Environ. Safe. 42: 138–142.

George-Ares, A. and Clark, J.R. 2000. Aquatic toxicity of two Corexit® dispersants. Chemosphere. 40: 897–906.

Girling, A.E. 1989. Preparation of aqueous media for aquatic toxicity testing of oils and oil-based products: A review of the published literature. Chemosphere. 19: 1635–1641.

Girling, A.E., Whale, G.F., and Adema, D.M.M. 1994. A guideline supplement for determining the aquatic toxicity of poorly water-soluble complex mixtures using Water-Accommodated Fractions. Chemosphere. 29: 2645–2649.

González-Doncel, M., González, L., Fernández-Torija, C., Navas, J.M., & Tarazona, J.V., 2008. Toxic effects of an oil spill on fish early life stages may not be exclusively associated to PAHs: studies with Prestige oil and medaka (*Oryzias latipes*). Aquat. Toxicol. 87(4): 280–288.

Government of Canada (GOC). 2013. Properties, composition and marine spill behaviour, fate and transport of two diluted bitumen products from the Canadian oil sands. Federal Government Technical Report. 1–85 p.

Hanson, M.L., Wolff, B.A., Green, J.W., Kivi, M., Panter, G.H., Warne, M.St.J., Ågerstrand, M., and Sumpter, J.P. 2016. How we can make ecotoxicology more valuable to environmental protection. Sci. Total Environ. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.07.160.

Harris, C.A., Scott, A.P., Johnson, A.C., Panter, G.H., Sheahan, D., Roberts, M., and Sumpter, J.P. 2014. Principles of sound ecotoxicology. Ecotox. Environ. Sci. Tech. 48: 3100–3111.

Hedayati, A. and Jahanbakhshi, A. 2012. The effect of water-soluble fraction of diesel oil on some hematological indices in the great sturgeon *Huso huso*. Fish Physiol. Biochem. 38(6): 1753–1758.

Hedtke, S.F. and Puglisi, F.A.1982. Short-term toxicity of five oils to four freshwater species. Arch. Environ. Con. Tox. 11(4): 425–430.

Heintz, R.A., Short, J.W., and Rice, S.D. 1999. Sensitivity of fish embryos to weathered crude oil: Part II. Increased mortality of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) embryos incubating downstream from weathered Exxon Valdez crude oil. Environ. Toxicol. Chem. 18: 494–503.

Heintz, R.A., Rice, S.D., Wertheimer, A.C., Bradshaw, R.F., Thrower, F.P., Joyce, J.E., and Short, J.W. 2000. Delayed effects on growth and marine survival of pink salmon *Oncorhynchus Gorbuscha* after exposure to crude oil during embryonic development. Mar. Ecol. Prog. Ser. 208: 205–216.

Hemmer, M.J., Barron, M.G., and Greene, R.M. 2011. Comparative toxicity of eight oil dispersants, Louisiana sweet crude oil (LSC), and chemically dispersed LSC to two aquatic test species. Environ. Toxicol. Chem. 30(10): 2244–2252.

Hemmingsen, P.V., Silset, A., Hannisdal, A., and Sjöblom, J. 2005. Emulsions of heavy crude oils. I: Influence of viscosity, temperature, and dilution. J. Dispers. Sci. Tech. 26: 615–627.

Hodson P.V., Khan, C., Saravanabhavan, G., Clarke, L., Brown, R.S., Hollebone, B.,Wang, Z., Short, J., Lee, K., and King, T. 2007. AlkylPAH in crude oil cause chronic toxicity to early life stages of fish. *In* Proceedings of 28th Arctic and Marine Oilspill Program Technical Seminar (AMOP). 291–300.

Hollebone, B.P. 2015. Appendix A. The oil properties data appendix. *In*: Handbook of Oil Spill Science and Technology. Edited by M.F. Fingas. Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ. pp. 577–681.

Hook, S.E., Lampi, M.A., Febbo, E.J., Ward, J.A., and Parkerton, T.F. 2010. Temporal patterns in the transcriptomic response of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, to crude oil. Aquat. Toxicol. 99: 320–329.

Incardona, J.P., Carls, M.G., Day, H.L., Sloan, C.A., Bolton, J.L., Collier, T.K., and Schoiz, N.L. 2009. Cardiac arrhythmia is the primary response of embryonic Pacific Herring (*Clupea Pallasi)* exposed to crude oil during weathering. Environ. Sci. Tech. 43: 201–207.

Incardona, J.P., Swarts, T.L., Edmunds, R.C., Linbo, T.L., Aquilina-Beck, A., Sloan, C.A., Gardner, L.D., Block, B.A., and Scholz, N.L. 2013. Exxon Valdez to Deepwater Horizon: Comparable toxicity of both crude oils to fish early life stages. Aqua. Toxicol. 142: 303–316.

Kaku, V.J., Boufadel, M.C., and Venosa, A.D. 2006. Evaluation of turbulence parameters in laboratory flasks used for dispersant effectiveness testing. J. Environ. Eng. 132: 93–101.

Kennedy, C.J. and Farrell, A.P. 2005. Ion homeostasis and interrenal stress responses in juvenile Pacific herring, *Clupea pallasi*, exposed to the water-soluble fraction of crude oil. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 323: 43–56.

Khelifa, A., Fingas, M., Hollebone, B.P., and Brown, C.E. 2007. Effects of chemical dispersants on oil physical properties and dispersion. *In* 13th Arctic and Marine Oil Spill Program Technical Seminar (AMOP), Environment Canada, Ottawa, Ontario, 105–116.

King, T.L., Robinson, B., Boufadel, M., and Lee, K. 2014. Flume tank studies to elucidate the fate and behavior of diluted bitumen spilled at sea. Mar Pollut. Bull. 83(1): 32–37. http://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.04.04.

Kiparissis, Y., Akhtar, P., Hodson, P.V., and Brown, R.S. 2003. Partition Controlled Delivery (PCD) of toxicants: a novel *in vivo* approach for embryotoxicity testing. Environ. Sci. Technol. 37: 2262–2266.

Kuhl, A.J., Nyman, J.A., Kaller, M.D., and Green, C.C. 2013. Dispersant and salinity effects on weathering and acute toxicity of South Louisiana crude oil. Environ. Toxicol. Chem. 32: 2611–2620.

Landrum, P.F., Chapman, P.M., Neff, J., and Page, D.S. 2013. Influence of exposure and toxicokinetics on measures of aquatic toxicity for organic contaminants: A case study review. Integrat. Environ. Assess. Manag. 9999: 1–15.

LaRoche, G., Eisler, R., and Tarzwell, C.M. 1970. Bioassay procedures for oil and oil dispersant toxicity evaluation. J. Water. Pollut. Cont. Fed. 42: 1982–1989.

Lee, R.F. 2003. Photo-oxidation and photo-toxicity of crude and refined oils. Spill Sci. Technol. B. 8 (2): 157–162.

Lee, K., Boufadel, M., Chen, B., Foght, J., Hodson, P.V., Swanson, S., and Venosa, A. 2015. Expert panel report on the behaviour and environmental impacts of crude oil released into aqueous environments. Royal Society of Canada, Ottawa, ON. ISBN: 978-1- 928140-02-3

Lessard, R.R. and Demarco, G. 2000. The significance of oil spill dispersants. Spill. Sci. and Tech. Bull. 6: 59–68.

Little, E.E., Cleveland, L., Calfee, R., and Barron, M.G. 2000. Assessment of the photoenhanced toxicity of a weathered oil to the tidewater silverside. Environ. Toxicol. Chem. 19(4): 926–932.

Lunel, T. 1993. Dispersion: oil drop size measurements at sea. In Proceedings, 19th Arctic Marine Oilspill Program (AMOP) Technical Seminar, Environment Canada, Ottawa, Ontario, 1023–1105.

Madison, B.N., Hodson, P.V., and Langlois, V.S. 2015. Diluted bitumen causes deformities and molecular responses indicative of oxidative stress in Japanese Medaka embryos. Aqua. Toxicol. 165: 222–230.

Maher, W.A. 1982. Preparation and characterization of water-soluble fractions of crude and refined oils for use in toxicity studies. Bull. Environ. Contamin. Toxicol. 29: 268–272.

Maher, W.A. 1986. Preparation of water soluble fractions of crude oils for toxicity studies. Bull. Environ. Contamin. Toxicol. 36: 226–229.

MARPOL. 2005. Regulation 21 - Prevention of oil pollution from oil tankers carrying heavy grade oil as cargo.

Martin, J.D., Adams, J., Hollebone, B.P., King, T., Brown, R.S., and Hodson, P.V. 2014. Chronic toxicity of heavy fuel oils to fish embryos using multiple exposure scenarios. Environ. Toxicol. Chem. 33: 677–687.

Marty, G.D., Heintz, R.A., and Hinton, D.E. 1997. Histology and teratology of pink salmon larvae near the time of emergence from gravel substrate in the laboratory. Can. J. Zool. 75: 978–988.

Mattos, J.J., Siebert, M.N., Luchmann, K.H., Granucci, N., Dorrington,T., Stoco, P.H., Gisard, E.C., and Bainy, A.C. 2010. Differential gene expression in *Poecillia vivpara* exposed to diesel oil water accommodated fraction. Mar. Environ. Res. 69: S31–S33.

McIntosh, S., King, T., Wu, D., and Hodson, P.V. 2010. Toxicity of dispersed weathered crude oil to early life stages of Atlantic herring (*Clupea harengus*). Environ. Toxicol. Chem. 29: 1160–1167.

McSheffrey, E. 2016. Environment Canada opens investigation as blobs of Husky oil contaminate river. National Observer. (accédé le 30 juillet 2016).

Melbye, A.G., Brakstad, O.G., Hokstad, J.N., Gregersen, I.K., Hansen, B.H., Booth, A.M., Rowland, S.J., and Tollefsen, K.E. 2009. Chemical and toxicological characterization of an unresolved complex mixture-rich biodegraded crude oil. Environ. Toxicol. Chem. 28: 1815–1824.

Moles, A. and Rice, S.D. 1983. Effects of crude oil and naphthalene on growth, caloric content, and fat content of pink salmon juveniles in seawater. T. Am. Fish Soc. 112(2A): 205–11.

National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine (NAS). 2016. Spills of Diluted Bitumen from Pipelines: A Comparative Study of Environmental Fate, Effects, and Response. Washington, DC: The National Academies Press.

National Ground Water Association. 2010. Brackish Groundwater. NGWA Information Brief. 7 pages.

National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA). 2008. Estuaries. NOAA ocean service education. (accessed August 23, 2016).

National Research Council (NRC). 2005. Toxicological effects of dispersants and dispersed oil. In: *Oil Spill Dispersants. Efficacy and Effects.* National Academies Press, Washington, DC. pp. 193–275.

Nexen. 2015. Long Lake Pipeline Failure, Incident Overview.

Nickel, R. and Williams, N. 2016. Husky says Canadian oil spill started day before pipeline was shut. Reuters Canada. (accessed July 30, 2016).

Nordtug, T., Olsen, A.J., Altin, D., MÉIEr, S., Overrein, I., Hansen, B.H., and Johansen, O. 2011. Method for generating parameterized ecotoxicity data of dispersed oil for use in environmental modelling. Mar. Pollut. Bull. 62: 2106–2113.

Østgaard, K. and Jensen, A. 1983. Preparation of aqueous petroleum solutions for toxicity testing. Environ. Sci. Tech. 17: 548–553.

Philibert, D.A., Philibert, C.P., Lewis, C., and Tierney, K. 2016. A comparison of diluted bitumen (dilbit) and conventional crude oil toxicity to developing zebrafish. Environ. Sci. Tech. 50: 6091–6098.

POLARIS Applied Sciences (POLARIS). 2013. A comparison of the properties of diluted bitumen crudes with other oils.

Prystupa, M. 2015. Massive Alberta oil spill bigger than Kalamazoo disaster. National Observer. (accessed 12 June 2016).

Ramachandran, S.D., Hodson, P.V., Khan, C.W., and Lee, K. 2004. Oil dispersant increases PAH uptake by fish exposed to crude oil. Ecotox. Environ. Safe. 59: 300–308.

Ramachandran, S.D., Sweezey, M.J., Hodson, P.V., Boudreau, M., Courtenay, S.C., Lee, K., King, T., and Dixon, J.A. 2006. Influence of salinity and fish species on PAH uptake from dispersed crude oil. Mar. Pollut. Bull. 52: 1182–1189.

Rand, G.M., Wells, P.G., and McCarty, L.S. 1995. Chapter 1, Introduction to Aquatic Toxicology In: *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment.* 2nd edition. Edited by Gary M. Rand. Washington DC, Taylor & Francis. 3–67.

Redman, A.D., McGrath J.A., Stubblefield, W.A., Maki, A.W., and Di Toro, D.M. 2012. Quantifying the concentration of crude oil microdroplets in oil-water preparations. Environ. Toxicol. Chem. 31: 1814–1822.

Redman, A.D., Parkerton, T.F., Letinski, D.J. Manning, R.G., Adams, J.E., and Hodson, P.V. 2014. Evaluating toxicity of heavy fuel oil fractions using complementary modeling and biomimetic extraction methods. Environ. Toxicol. Chem. 33: 2094–2104.

Redman, A.D. and Parkerton, T.F. 2015. Guidance for improving comparability and relevance of oil toxicity tests. Mar. Pollut. Bull. 98: 156–170.

Rico-Martínez, R., Snell, T.W., and Shearer, T.L. 2013. Synergistic Toxicity of Macondo crude oil and dispersant Corexit 9500A to the *Brachionus plicatilis* species complex (*Rotifera*). Environ. Pollut. 173: 5–10.

Rhoton, S.L., Perkins, R.A., Braddock, J.F, and Behr-Andres, C. 2001. A cold-weather species' response to chemically dispersed fresh and weathered Alaska North Slope crude oil. *In* International Oil Spill Conference 2001: 1231–36.

Rufli, H., Fisk, P.R., Girling, A.E., King, J.M.H., Länge, R., Lejeune, X., Stelter, N., Stevens, C., Suteau, P., Tapp., J., Thus, J., Versteeg, D.J., and Neissen, H.J. 1998. Aquatic toxicity testing of sparingly soluble, volatile, and unstable substances and interpretation and use of data. Ecotox. Environ. Safe. 39: 72–77.

Santos, C.A., Lenz, D., Brandao, G.P., Chippari-Gomes, A.R., and Gomes, L.C. 2013. Acute toxicity of the water-soluble fraction of diesel in *Prochilodus vimboides* Kner (Characiformes: Prochilodontidae). Neotrop. Icthyol. 11: 193–198.

Schein, A., Scott, J.A., Mos, L., and Hodson, P.V. 2009. Oil dispersion increases the apparent bioavailibilty and toxicity of diesel to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environ. Toxicol. Chem. 28: 595–602.

Shiu, W.Y., Bobra, M., Bobra, A.M., Maijanen, A., Suntio, L., and Mackay, D. 1990. The water solubility of crude oils and petroleum products. Oil & Chemical Pollution 7: 1–2.

Shukla, P., Gopalani, M., Ramteke, D.S., and Wate, S.R. 2007. Influence of salinity on PAH uptake from water soluble fraction of crude oil in *Tilapia mossambica*. B. Environ. Contam. Tox. 79: 601–605.

Simonato, J.D., Guedes, C.L., and Martinez, C.B. 2008. Biochemical, physiological, and histological changes in the neotropical fish *Prochilodus lineatus* exposed to diesel oil. Ecotox. Environ. Safe. 69(1): 112–120.

Singer, M.M., Aurand, D., Bragin, G.E., Clark, J.R., Coelho, G.M., Sowby, M.L., and Tjeerdema, R.S. 2000. Standardization of the preparation and quantitation of water-accommodated fractions of petroleum for toxicity testing. Mar. Pollut. Bull. 40: 1007–1016.

Singer, M.M., Aurand, D.V., Coelho, G.M., Bragin, G.E., Clark, J.R., Sowby, M., and Tjeerdema, R.S. 2001a. Making, measuring, and using water-accommodated fractions of petroleum for toxicity testing. *In* International Oil Spill Conference 2001 2: 1269–1274.

Singer, M.M., Jacobson, S., Tjeerdema, R.S., and Sowby, M. 2001b. Acute effects of fresh versus weathered oil to marine organisms: California findings. *In* International Oil Spill Conference Proceedings 1: 1263–1268.

SL Ross. 2012. Meso-scale weathering of Cold Lake bitumen/condensate blend. SL Ross Environmental Research Ltd, #200 - 1140 Morrison Drive, Ottawa, ON K2H 8S9

Sørhus, E., Edvardsen, R.B., Karlsen, O., Nordtug, T., van der Meeren, T., Thorsen, A., Harman, C., Jentoft, S., and Meier, S. 2015. Unexpected interaction with dispersed crude oil droplets drives severe toxicity in Atlantic haddock embryos. Plos One. 10(4): e0124376.

Speight, J.G. 2006. The chemistry and technology of petroleum. CRC Press, New York, NY. 143-174, 4th Edition.

Speight, J.G. 2014. The Chemistry and Technology of Petroleum. 5th Edition. CRC Press, Hoboken, NJ.

Sprague, J.B. 1969. Measurement of Pollutant Toxicity to Fish I. Bioassay methods for acute toxicity. Water. Res. 3: 793–821.

Sprague, J.B. 1970. Measurement of Pollutant Toxicity to Fish. II. Utilizing and applying bioassay results. Water. Res. 4: 3–32.

Sprague, J.B. 1971. Measurement of pollutant toxicity to fish - III Sublethal effects and 'safe' concentrations. Water. Res. 5: 245–266.

Sprague, J.B. 1995. Appendix C, Factors that Modify Toxicity. In: *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment*. 2nd edition. Edited by Gary M. Rand. Washington DC, Taylor & Francis. 1012–1051.

Stokes, V.K. and Harvey, A.C. 1973. Drop size distributions in oil water mixtures. *In* International Oil Spill Conference Proceedings. 1973: 457–465.

Swedmark, M., Granmo, Å., and Kollberg, S. 1973. Effects of oil dispersants and oil emulsions on marine animals. Water. Res. 7(11): 1649–1672.

Timme-Laragy, A.R., Cockman, C.J., Matson, C.W., and Di Giulio, R.T. 2007. Synergistic Induction of AHR regulated genes in developmental toxicity from co-exposure to two model PAHs in zebrafish. Aqua. Toxicol. 85: 241–250.

Tjeerdema, R.S., Lin, C.Y., Anderson, B.S., Viant, M.R., Crane, D., and Sowby, M.L. 2007. Effects of oil on the smolts of salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*)–preliminary muscle results. Proceedings: Papers, p.207.

Tsvetnenko, Y. and Evans, L. 2002. Improved approaches to ecotoxicity testing of petroleum products. Mar. Pollut. Bull. 45: 148–156.

USEPA. Method EPA SW-846 (accessed March 1, 2017)

Ward, G.S. 1995. Chapter 3, Saltwater Tests. In: *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment*. 2nd edition. Edited by Gary M. Rand. Washington DC, Taylor & Francis. 103–133.

Wilson, K.W. 1977. Acute toxicity of oil dispersants to marine fish larvae. Mar. Biol. 40: 65–74.

Woodward, D.F., Little, E.E., and Smith, L.M. 1987. Toxicity of five shale oils to fish and aquatic invertebrates. Arch. Environ. Con. Tox. 16(2): 239–246.

Wu, D., Wang, Z., Hollebone, B., McIntosh, S., King, T., and Hodson, P.V. 2012. Comparative toxicity of four chemically dispersed and undispersed crude oils to rainbow trout embryos. Environ. Toxicol. Chem. 31: 754–765.

Yang, C., Wang, Z., Yang, Z., Hollebone, B., Brown, C.E., Landriault, M., and Fieldhouse, B. 2011. Chemical fingerprints of Alberta oil sands bitumen and related petroleum products. Environ. Forensics. 12: 173–188.

Yoon, S., Bhatt, S.D., Lee, W., Lee, H.Y., Jeong, S.Y., Baeg, J.-O., and Lee, C.W. 2009. Separation and characterization of bitumen from Athabasca oil sand. Korean. J. Chem. Eng. 26: 64–71.

Yu, X., Xu, C., Liu, H., Xing, B., Chen L., and Zhang, G. (2015). Effects of crude oil and dispersed crude oil on the critical swimming speed of puffer fish, *Takifugu rubripes*. B. Environ. Contam. Tox. 94: 549–553.

Ziolli, R.L. and Jardim, W.F. 2002. Operational problems related to the preparation of the seawater soluble fraction of crude oil. J. Environ. Monit. 4: 138–141.

9 ANNEXES

ANNEXE 1 : PROTOCOLES DÉFINIS PAR LE CROSERF

Tableau A1 : Protocoles du CROSERF pour les essais de toxicité aiguë des hydrocarbures en milieu marin menés sur des solutions de fractions adaptées à l'eau (WAF) et de fractions adaptées à l'eau améliorées chimiquement (CEWAF). Ce tableau a été modifié à partir d'Aurand et Coelho 2005 [a] et les renseignements ont été compilés à partir d'Aurand et Coelho 2005 [a] et de Barron et Ka'aihue 2003 [b].

PARAMÈTRE		WAF	CEWAF
Préparation de l'eau		• Filtration minimale de 0,45 µm • Eau de mer locale de préférence; diluer avec de l'eau désionisée, au besoin (eau de mer reconstituée acceptable) • Si l'eau de mer naturelle n'est pas disponible, utiliser de l'eau connue pour soutenir une bonne survie et une bonne santé des organismes mis à l'essai • Utiliser la même eau pour préparer les solutions WAF / CEWAF et l'eau de dilution	
Préparation du pétrole	*Frais*	• Inclure une huile de référence à titre de témoin positif; PBCO (pétrole brut de la baie Prudhoe) • Aucune préparation nécessaire • Voir entreposage et manutention	
	Altéré	• Inclure une huile de référence à titre de témoin positif; PBCO • Devrait être altéré artificiellement dans des conditions contrôlées (éviter ou minimiser l'altération naturelle impossible à reproduire) • Cibler l'équivalent de 6 à 24 heures d'altération (environ 20 % pour les pétroles bruts) • Suivre la méthode ASTM D2892 (la méthode D86 est une solution de rechange acceptable) • Il est recommandé de confier la distillation fractionnée à un laboratoire d'analyses commercial pour caractériser le pétrole altéré • Voir entreposage et manutention	
Taille du récipient de mélange		• En fonction du volume de solution WAF / CEWAF requis • 1 litre à 20 litres	
Taille du barreau d'agitation		• Doit être choisie de manière à correspondre à la taille du contenant ou de la plaque d'agitation • Recommandée : environ 1 po pour 2 litres et environ 2 po pour 20 litres	
Ajout du pétrole		• Ajouter un volume connu de pétrole au centre du conteneur à l'aide d'une seringue Hamilton étanche aux gaz pendant le mélange • Calculer la masse produite par la différence de poids • Charge de pétrole dans l'eau de 0,01-25 g/l [b] (pas de dilution en série)	
Ajout du dispersant		S.O.	• Corexit 9500 ou 9527, ratio dispersant/pétrole de 1:10 [b] • Ajouter un volume connu de dispersant aux hydrocarbures (en ordre séquentiel) au centre du tourbillon à l'aide d'une

PARAMÈTRE		WAF	CEWAF
Ajout du dispersant		S.O.	seringue Hamilton étanche aux gaz une fois le tourbillon créé • Calculer la masse produite par la différence de poids • Ne pas mélanger le pétrole et le dispersant à l'avance
Espace de tête		• Espace de tête de 20-25 % lorsque le contenant de mélange est rempli jusqu'à la base de l'épaule	
Énergie de mélange		• À l'origine, 3-4 tr/s (180-240 tr/min), ou aussi peu que nécessaire pour éviter le tourbillon (éviter la sédimentation et l'émulsification)	• Tourbillon de 20-25 % de la profondeur de l'eau • Effectuer un essai préalable sur le pétrole afin de déterminer comment il faut ajouter le pétrole et les dispersants à l'eau
Conditions de mélange	*Température*	• Environnement à température contrôlée • La température doit être adaptée à l'organisme mis à l'essai	
	Lumière	• Mélanger dans l'obscurité [a] ou sous un éclairage de laboratoire (fluorescent) [b]	
Durée du mélange		• En fonction du type d'hydrocarbures et du taux de charge • La stabilité des solutions est déterminée par leur chimie	• On recommande 18 heures, mais la durée doit être optimisée pour chaque pétrole, comme la WAF • Ne doit pas dépasser 24 heures (de manière à éviter la biodégradation) • La stabilité des solutions est déterminée par leur chimie
Durée de sédimentation		• Pas de sédimentation avant l'extraction de la couche aqueuse • Utilisation recommandée immédiatement après le mélange • Au besoin, la solution WAF peut être entreposée au maximum pendant 24 heures avant l'utilisation	• Sédimentation minimale de 3 heures, maximale de 6 heures • Utiliser immédiatement après la sédimentation
Entreposage et manipulation	*Hydrocarbures*	• Entreposer dans des contenants métalliques ou en verre hermétiquement fermés avec un espace de tête minimum • Entreposer dans l'obscurité à < 5 °C • Caractérisation chimique recommandée du pétrole entreposé afin de surveiller les changements de la composition au fil du temps	
	Solution	• Peut être conservée dans des poches en téflon	• Doit être utilisée immédiatement (mais semble stable pendant au moins 24 heures)

PARAMÈTRE		WAF	CEWAF
Entreposage et manipulation	*Solution*	• Ne pas congeler — les cires et les asphaltènes peuvent se séparer du pétrole • Les échantillons prélevés aux fins d'analyse chimique doivent être acidifiés immédiatement et analysés dans un délai de 7 jours pour les volatils (BTEX) à 14 jours pour les composés semi-volatils	
Essais de toxicité	*Organismes mis à l'essai*	• Les lignes directrices pour l'aquaculture et la manipulation des animaux doivent suivre celles publiées par l'ASTM, l'OCDE, l'EPA, etc. • Introduire les organismes dans les traitements au hasard • Les procédures d'acclimatement, la salinité et la température de la cuve de rétention, la photopériode et l'intensité lumineuse, la nourriture et les paramètres de la qualité de l'eau doivent être adaptés à l'organisme mis à l'essai • Observer la mortalité et les autres effets chaque jour • Ne pas retirer les animaux morts	
	Traitements	• La dilution en série n'est pas recommandée • Utiliser plutôt la charge variable	
	Régime d'exposition	Exposition additionnée : • Commencer l'essai en rinçant toutes les enceintes avec de l'eau limpide, aérée et filtrée, puis en les remplissant avec la solution d'essai • Flux constant de 2 ml/min (dans une enceinte d'essai de toxicité à flux constant de 240 ml du CROSERF) • Enceinte scellée une fois que les animaux y ont été placés • Surveiller la diminution de la concentration pendant les 6 à 8 premières heures • Exposition moyenne de 96 heures (toxicité aiguë)	
		Exposition constante • Commencer l'essai en remplissant les contenants d'essai avec de l'eau limpide, aérée et filtrée, puis en les remplissant avec la solution d'essai • Aération 1-2 bulles/s • Recouvrir les contenants d'un couvercle en verre après y avoir placé les animaux • Retirer 90 % de la vieille solution toutes les 24 h et les remplacer par de la solution fraîche • Exposition moyenne de 96 heures (toxicité aiguë)	
	Paramètres	• Létalité (p. ex., CL50 sur 96 h) • « Effet initial » narcose / moribondité (CE50 sur 0,5 à 1 h)	
Caractérisation chimique	• Mesurer les concentrations d'hydrocarbures pétroliers totaux et de composés volatils en ppm		

PARAMÈTRE		WAF	CEWAF
Caractérisation chimique	*HCP totaux* ($C_{10} - C_{36}$)	• Mesurés dans les solutions WAF et la CEWAF fraîches avant les essais de toxicité et à la fin des expériences pour les essais statiques; avant chaque renouvellement pour les expositions constantes; à un ou plusieurs points durant l'expérience pour les expositions additionnées • Utiliser la méthode GC-FID. Si une autre méthode est utilisée, fournir une comparaison de la méthode utilisée à la méthode GC-FID • Utiliser au moins un étalon substitut : o-terphényle avec récupération de 70 à 120 % • Utiliser un étalon interne qui ne coélue pas avec l'hydrocarbure en question • Ne pas corriger pour tenir compte de la récupération • Limite de détection ≤10 ppm pour les n-alcanes présents dans l'étalon • Mesurer les HAP (facultatif)	
	Composés volatils ($C_6 < C_{10}$)	• Mesurés dans les huiles initiales, les solutions WAF et la CEWAF fraîches avant les essais de toxicité et à la fin des expériences pour les essais statiques; avant chaque renouvellement pour les expositions constantes; à un ou plusieurs points durant l'expérience pour les expositions additionnées • Utiliser la méthode GC-FID ou GC-MS. Si une autre méthode est utilisée, comparer les résultats à ceux obtenus par la méthode GC-FID ou GC-MS • Utiliser un étalon interne • Le d-toluène est recommandé comme étalon substitut avec la méthode GC-MS • Voir la liste des analytes cibles minimaux à l'annexe 2, tableau 2A	
	Composés semi-volatils précis	• Facultatif, tenir compte des limites financières et temporelles • Choisir une méthode d'analyse précise en fonction des analytes cibles, de l'équipement disponible et du rendement • Voir la liste des analytes cibles optionnels à l'annexe 2, tableau 2A	
	Solutions de dispersant uniquement	S.O.	• Utiliser une série de concentrations (de 1 à 1 000 ppm) de dispersant pour créer la courbe d'étalonnage • Utiliser le même diluant à l'eau de mer que pour les essais de toxicité • Analyser les échantillons dans les 2 heures suivant la spectrophotométrie UV-VIS • Utiliser les maxima d'absorption du dispersant pour toutes les analyses

PARAMÈTRE	WAF	CEWAF
Analyse statistique	• Utiliser un essai selon la méthode des probits si les données sont normalement distribuées • Pour les distributions non paramétriques (s'il n'y a pas de mortalité témoin), réaliser un essai Spearman-Kärber ou Spearman-Kärber avec équeutage • Utiliser la méthode binomiale dans les situations où il n'y a pas de mortalité partielle (c.-à-d. une mortalité de 0 ou de 100 %) ou recommencer l'essai avec une fourchette différente de concentrations • Préciser les méthodes statistiques utilisées chaque fois que la CL50, la CE50 ou d'autres données sur la toxicité sont présentées	

ANNEXE 2: LISTES D'ANALYTES CIBLES POUR L'ANALYSE DES COMPOSÉS VOLATILS ET SEMI-VOLATILS

Tableau A2.1 : Les listes d'analytes cibles minimaux pour les analyses des composés volatils et semi-volatils par le CROSERF ont été décrites dans Aurand et Coelho (2005; tableau 3.3 et tableau 3.4).

Méthode d'analyse	Liste d'analytes minimaux	
Analyse des composés volatils	Saturés	
	• 2-méthylpentane • Hexane • Cyclopentane • 2,4-diméthylpentane • Cyclohexane	• Heptane • Cycloheptane • Octane • Nonane
	Non saturés	
	• Benzène • Toluène • Éthylbenzène • p-xylène	• m-xylène • o-xylène • n-propylbenzène • C_3-benzènes
Analyse des composés semi-volatils (facultative)	• Naphthalènes (C_0-C_4) • Biphényl • Fluorènes (C_0-C_3) • Dibenzothiophènes (C_0-C_4) • Phénanthrènes (C_0-C_4) • Fluoranthène • Pyrènes (C_0-C_4) • Chrysènes (C_0-C_4) • Benzo[a]anthracène	• Benzo[b]fluoranthène • Benzo[k]fluoranthène • Benzo[e]pyrène • Benzo[a]pyrène • Pérylène • Indéno[1,2,3— c,d]pyrène • Dibenzo[a,h]anthracène • Benzo[g,h,i]pérylène

Tableau A2.2 : Listes d'analytes cibles recommandés aux fins d'analyse des composés volatils et semi-volatils d'après la présente analyse documentaire. Liste des HAP51 totaux non saturés adaptée de la liste des HAP50 de Forth et al. (2016), plus pérylène tiré d'Aurand et Coelho (2005).

Méthode d'analyse	Liste d'analytes minimaux	
Analyse des composés volatils	Saturés	
	• Pentane • 2-méthylpentane • Hexane • Cyclopentane • 2,4-diméthylpentane	• Cyclohexane • Heptane • Cycloheptane • Octane • Nonane
	Non saturés	
	• Benzène • Toluène • Éthylbenzène • p-xylène • m-xylène	• o-xylène • n-propylbenzène • Cumène • Autres C_3-benzènes
Analyse des composés semi-volatils (facultative)	• Naphthalènes (C_0-C_4) • Biphényl • Dibenzofuranne • Acénaphthylène • Acénaphthène • Fluorènes (C_0-C_3) • Anthracène • Phénanthrène • Phénanthrènes (C_1-C_4) / Anthracènes (C_1-C_4) • Dibenzothiophènes (C_0-C_4) • Benzo[b]fluorène • Fluoranthène • Pyrène • Pyrènes (C_1-C_4) / Fluoranthènes (C_1-C_4)	• Naphthobenzothiophènes (C_0-C_4) • Benzo[a]anthracène • Chrysène + Triphénylène • Chrysènes (C_1-C_4) • Benzo[b]fluoranthène • Benzo[j+k]fluoranthène • Benzo[a]fluoranthene • Benzo[e]pyrène • Benzo[a]pyrène • Pérylène • Indéno[1,2,3— c,d]pyrène • Dibenzo[a,h]anthracène • Benzo[g,h,i]pérylène

ANNEXE 3 : CATÉGORISATION DES ESPÈCES DE POISSONS UTILISÉES DANS LES ESSAIS DE TOXICITÉ DU PÉTROLE, PAR HABITAT

Tableau A3 : Catégorisation des espèces de poissons utilisées dans les essais de toxicité du pétrole, par habitat (eau de mer, eau douce ou les deux) et préférence en matière de température de l'eau (eau chaude ou eau froide). Les entrées pour chaque espèce de poissons comprennent le nom latin (Genre et espèce). Les poissons qui se trouvent dans les eaux canadiennes sont soulignés (Pêches et Océans Canada; Espèces aquatiques). Les espèces suivies d'un astérisque sont des espèces d'essai standards d'ECCC[2].

	Espèces d'eau de mer	Espèces d'eau douce	Les deux (Espèces anadromes)
Espèces d'eau chaude	• Loche pintade (*Ephinephelus chlorostignma*) • (*Anoplarchus purpurescens*) • Bar commun (*Dicentrarchus labrax*) • Plie (*Pleuronectes flesus*) • Fondule (*Fundulus grandis*) • (*Prochilodus vimboides*) • Capucette nord-américaine (*Menidia beryllina*) • Fondule à long nez (*Fundulus similis*) • Mahi-mahi (*Coryphaena hippurus*) • (*Oryzias melastigma*) • Cardeau hirame (*Paralichthys olivaceus*) • Sigan pintade (*Siganus canaliculatus*) • Tambour rouge (*Sciaenops ocellatus*) • Daurade japonaise (*Pagrus major*) • Vivaneau rouge (*Lujanus argentimaculatus*) • Sébaste (*Sebastes schlegeli*) • Fondule tête de mouton (*Cyprinodon variegatue*) • Daurade ordinaire (*Chrysophrys auratus*) • Tambour croca (*Leiostomus xanthurus*) • Acoupa pintade (*Cynoscion nebulosus*) • (*Lateolabrax maculates*) • (*Notolabrus celidotus*) • Capucette barrée (*Atherinops affinis*) • Grande sériole (*Seriola lalandi*)	• Poisson-chat africain (*Clarias gariepinus*) • Oscar (*Astronatus ocellatus*) • (*Jordanella floridae*) • *Astyanax* sp. • (*Melanotaenia fluviatilis*) • Guppy (*Poecilia vivipara*) • Médaka japonais (*Oryzias latipes*) • Sábalo (*Prochilodus lineatus*) • Tilapia du Nil (*Oreochromis niloticus*) • Tilapia du Mozambique (*Tilapia mossambica*) • (*Colossoma macropomum*) • Poisson zèbre (*Danio rerio*)	• Bar australien (*Macquaria novemaculeata*) • Cyprinoïde du Colorado (*Ptychocheilus lucius*) • Grand esturgeon (*Huso huso*) • Choquemort (*Fundulus heteroclitus*)

[2] Les données ont été compilées à partir de : Fish Base, Évaluation de Fundulus heteroclitus, Feuillet d'information sur l'aiglefin du MPO, Feuillet d'information sur la morue (Norvège) et Animal World Pet Encyclopedias.

	Espèces d'eau de mer	Espèces d'eau douce	Les deux (Espèces anadromes)
Espèces d'eau froide	• Morue arctique (*Boreogadus saida*) • Morue franche (*Gadus morhua*) • Aiglefin (*Melanogrammus aeglefinus*) • Hareng de l'Atlantique (*Clupea harengus*) • Alose tyran (*Brevoortia tyrannus*) • Capucette (*Menidia Menidia*) • (*Pagothenia borchgrevinki*) • Capelan (*Mallotus villosus*) • Sigouine lunée (*Pholis laeta*) • Tanche-tautoque (*Tautogolabrus adspersus*) • Dolly Varden (*S. malma*) • Mulet doré (*Liza aurata*) • Sole d'eau douce américaine (*Trinectes maculatus*) • Chaboisseau à dix-huit épines (*Myoxocephalus octodecemspinosus*) • (*Odontesthes argentinensis*) • Mulet (*Mugil cephalus*) • Morue franche (*Gadus morhua*) • Hareng du Pacifique (*Clupea pallasi*) • Poisson-globe (*Takifugu rubripes*) • Chabot (*Myoxocephalus sp., polyacanthocephalus*) • Flet étoilé (*Platichthys stellatus*) • Mulet porc (*Liza ramada*) • (*Aulorhynchus flavidus*) • Flétan noir (*Scophthalmus maximus L.*) • Goberge de l'Alaska (*Theragra chalcogrammus*)	• (*Rutilus caspicus*) • Poisson-chat (*Hoplosternum littorale, bidorsalis*) • Tête-de-boule (*Pimephales promelas*)*	• Saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*) • Saumon quinnat (*Oncorhynchus tshawytscha*) • Truite fardée (*O. clarki*) • Saumon du Pacifique (*Oncorhynchus nerka*) • Saumon rose (*Oncorhynchus gorbuscha*) • Truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*)

ANNEXE 4 : EXIGENCES DE DÉCLARATION RECOMMANDÉES POUR LES ESSAIS DE TOXICITÉ, ADAPTÉ DE HANSON *ET AL.* (2016)

Tableau A4 : Des directives supplémentaires provenant d'autres sources ou propres à un pétrole testé ont été ajoutées à la référence indiquée en exposant; CONCAWE 1993[a], Redman et Parkerton 2015[b], ajouts tirés de ce document[c]. Lorsque des sections mentionnées dans le texte sont tirées de Hanson et al. (2016), leur numérotation a été corrigée afin de correspondre à celle de ce tableau, plutôt qu'à celle de la publication.

Exigences de déclaration minimales pour les études d'écotoxicologie
1. Origine et propriétés du composé mis à l'essai Origine et pureté indiquées? • Origine, pureté et composition de la substance mise à l'essai; plus précisément, le pourcentage d'ingrédients actifs, y compris les niveaux ou les ratios de composants et des isomères et les impuretés. a. Inclure la description du pétrole (p. ex., pétrole brut, produits pétroliers raffinés) et de l'état d'altération[b] b. Chimie des hydrocarbures[c] c. Pour les dispersions chimiques, fournir la chimie et les caractéristiques[c] Nom technique? • Nom technique (p. ex., celui de l'International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) ou numéro d'inscription, numéro de registre du Chemical Abstract Service (CAS), numéro de lot et formulation, marque de commerce ou appellation commerciale. a. Information sur l'extraction, le raffinage, l'entreposage et la manutention du pétrole[c]
2. Conception expérimentale Le cas échéant, est-ce que les hypothèses sont énoncées? • Les hypothèses et les objectifs de l'étude doivent être clairement énoncés, même si l'hypothèse est aussi simple que « le composé X provoque une réduction de 50 % du nombre d'œufs pondus par rapport au témoin à une concentration inférieure à la solubilité aqueuse ». Nombre de traitements et leurs niveaux d'exposition? • Le nombre de traitements et les concentrations nominales. Nombre et type de témoins? • Le nombre et les types de témoins (p. ex., positif, négatif ou solvant). En cas d'utilisation d'un solvant porteur, sa concentration dans chaque traitement et témoin doit être égale et précisée. Durées d'exposition? • Méthodes de création et d'entreposage des solutions de stock et de travail et durée de l'entreposage. a. Description des méthodes recommandées pour créer les solutions des essais de toxicité du pétrole[a] : - type de milieu préparé (WAF ou dispersion) i. et substrat mazouté, gravier par exemple. Buses d'écoulement des gouttelettes de pétrole[b] ii. Procédure de dispersion : physique (énergie de mélange faible ou élevée), chimique (type de dispersant, ration dispersant/pétrole), durée des périodes d'équilibre et de sédimentation, température et salinité des médias aqueux[b] - type de système de mélange - masse du matériel d'essai et du milieu (ratio pétrole/eau, ration pétrole/substrat[c]) - géométrie du récipient de mélange (volume du récipient de mélange[c]) - récipient de mélange scellé ou ouvert - volume de l'espace de tête

Exigences de déclaration minimales pour les études d'écotoxicologie
- méthode de mélange, y compris la vitesse du rotor, etc. (énergie de mélange[c]) - durée du mélange et temps de sédimentation/séparation - méthode de séparation des phases pour la préparation des solutions WAF - type de dispersant chimique (le cas échéant) • Régime d'exposition pour la substance d'essai (p. ex., statique, semi-statique ou flux continu) avec des détails au sujet de la méthode et du régime de renouvellement. a. Définir la période d'exposition[c] b. Approche utilisée pour établir la concentration en fonction des traitements : préparation à des charges multiples ou préparation à une charge unique, puis diluée en série[b] c. Faire la distinction entre une exposition continue ou décroissante[b] • Fréquence d'exposition (p. ex., la fréquence à laquelle la substance d'essai est administrée ou renouvelée) et type d'échantillons analysés pour déterminer les concentrations de substances toxiques. • Méthode et conception pour déterminer l'ordre dans lequel les organismes mis à l'essai sont ajoutés dans les récipients d'essai et le placement des récipients d'essai (p. ex., aléatoire, stratifié aléatoire ou carré latin). Nombre de réplicats? • Degré de réplication de chaque traitement et témoin et explication pour indiquer s'il s'agit de vrais réplicats ou de pseudo-réplicats. *Autres* • La voie d'exposition à l'organisme mis à l'essai doit être clairement énoncée (p. ex., par l'intermédiaire du régime alimentaire, des milieux, etc.). • Détails sur toutes les procédures d'assurance de la qualité et de contrôle de la qualité réalisées dans le cadre de l'étude (p. ex., si la conception était aveugle ou double aveugle, si la notation, la saisie des données et les calculs ont été effectués par un ou plusieurs individus, et voir la section 4 : Conditions expérimentales, qui traite de la qualité de l'eau, etc.).
3. Caractéristiques des organismes mis à l'essai Nom, origine et souche de l'espèce déclarés? • Sélection de l'espèce — Justifier l'organisme sélectionné (p. ex., la pertinence écologique ou la pertinence par rapport à l'hypothèse). • Identité de l'espèce — Indiquer le nom courant et le nom scientifique de l'espèce, le type général (p. ex., plante), son origine et la souche (s'il y a lieu). Fournir les détails des codes à barres de l'ADN, s'ils sont connus. Pour travailler avec des espèces nouvelles ou cryptiques, il est recommandé de donner l'identification génétique, p. ex., l'algue *Oophila sp.* (Baxter *et al.* 2015) ou la complexité spécifique *Hyalella azteca* (Leung *et al.* 2016). • Origine – Cultures à l'interne, populations sauvages et, s'il y a lieu, inclure la méthode de collecte (p. ex., collecte des œufs fécondés ou animaux sauvages) et leur traitement subséquent. • Cycle biologique — Indiquer le stade du cycle vital, l'âge et le sexe des organismes mis à l'essai, le nombre par traitement, et la taille ou masse au début de l'expérience. Est-ce que les critères de rendement des témoins ont été respectés? • Rendement de l'espèce mise à l'essai — Fournir les données historiques disponibles sur les paramètres (p. ex., taux de croissance, reproduction) utilisés dans le cadre de cette expérience, permettant de mettre en contexte les données recueillies pendant l'expérience. Par exemple, un changement perceptible de la croissance pourrait ne pas être jugé important sur le plan biologique lorsqu'il est comparé aux données de contrôle historiques du laboratoire effectuant l'essai (Länge *et al.* 2001). Il faut indiquer le rendement des témoins afin de permettre la comparaison aux critères de validation. Est-ce que les protocoles d'élevage ont été énumérés? • Élevage — Indiquer toutes les procédures visant à maintenir les organismes en bon état. Donner des aperçus des approbations relatives au bien-être et à l'éthique, en particulier celles qui peuvent avoir une incidence sur les réactions observées (p. ex., degré d'enrichissement, regroupements). Signaler les épidémies de maladies ou de morbidité / mortalité inexpliquée, y compris leur incidence et leur gravité, ainsi que la façon dont elles ont été traitées.

Exigences de déclaration minimales pour les études d'écotoxicologie
4. Conditions expérimentales Est-ce que les conditions générales de l'essai ont été décrites? • Installations d'essai générales – Par exemple, chambre de croissance (marque, modèle), réservoir (dimensions, capacité, taux de changement de l'eau), mésocosme (emplacement, volume, débit), serre (emplacement, taille), emplacement sur le terrain (coordonnées GPS, renseignements climatiques et environnementaux généraux pour la durée de l'étude). • Conditions de l'essai — Fournir tous les détails disponibles sur les paramètres expérimentaux pertinents tels que l'intensité de la lumière, la photopériode et la température sous la forme de moyennes, avec la variabilité. a. Récipients d'essai, p. ex., ouvert ou fermé, volume de l'espace de tête, ajout de nourriture[b] b. Inclusion de lumière du soleil naturelle ou simulée, c'est-à-dire longueur d'ondes, intensité, durée du rayonnement ultraviolet[b] Origine et état des milieux? • Origine, type et composition des milieux de l'essai — p. ex., eau, milieux disponibles dans le commerce, sol, sédiments, y compris les contaminants de fond connus. • Paramètres des milieux de l'essai — Préciser toutes les mesures qui peuvent avoir une incidence sur la santé ou la modification de l'organisme mis à l'essai ou modifier les réponses des paramètres (p. ex., concentration d'oxygène dissous, la température, pH, salinité) sous la forme de moyennes, avec une estimation de la variabilité (p. ex., intervalles de confiance). En outre, indiquer les propriétés des milieux de l'essai qui peuvent avoir une influence sur l'interprétation des résultats de l'essai (p. ex., carbone organique dissous, lorsque l'on prévoit la fixation du matériel d'essai). • Mécanisme de dosage – p. ex., par l'intermédiaire du régime alimentaire, de pompes péristaltiques, application par pulvérisation. Acclimatement et alimentation? • Détails sur l'acclimatement – Pour le système d'essai et les organismes mis à l'essai. En ce qui concerne le système d'essai, il s'agit de démontrer que les conditions sont stables avant l'introduction des organismes mis à l'essai. Cela revêt une importance particulière dans les études du mésocosme et des sédiments. Pour ce qui est des organismes d'essai, il s'agit d'assurer la survie et la croissance dans les conditions de l'expérience (pour obtenir de plus amples renseignements, voir la section 3 : Caractéristiques des organismes mis à l'essai). • Alimentation – L'information doit comprendre le type de nourriture, l'origine, la quantité fournie et la fréquence de l'alimentation. Dans le cas des aliments commerciaux, donner des indications détaillées sur les caractéristiques. Inclure la concentration de tous les contaminants, s'il y a lieu. *Autres* • Nombre et densité des organismes — Peuvent dépendre du but du test ou de la conception de l'expérience (p. ex., puissance de l'essai, voir la section 8 : Analyse statistique). Néanmoins, la conception de l'essai doit permettre un comportement normal de l'organisme mis à l'essai. La densité des organismes mis à l'essai permettra de déterminer les exigences d'alimentation adéquates et la charge acceptable. • Études sur les bonnes pratiques de laboratoire (BPL) — Lorsque les données sont issues d'une étude BPL, il faut l'indiquer expressément dans la publication, ainsi que l'emplacement des données brutes. • Indiquer les activités d'assurance de la qualité et de contrôle de la qualité (AQ/CQ) – (p. ex., l'étalonnage de l'équipement de laboratoire) et leurs résultats. Si des procédures normales d'exploitation (PNE) sont utilisées, préciser leur emplacement.
5. Confirmation de l'exposition Énoncé clair des échantillons qui ont été analysés? • Fournir suffisamment de détails sur l'approche analytique, ou une référence appropriée, qui appuie l'approche adoptée. • Indiquer clairement quels échantillons ont été analysés (p. ex., stocks seulement, récipients d'exposition, mis en commun ou non) et le moment ou la fréquence des mesures. Cela est important pour interpréter la pertinence de la réaction observée à la lumière de la durée d'exposition réelle, quelle que soit la longueur de l'essai. • Indiquer le type de milieu et les volumes échantillonnés, ainsi que les conditions d'entreposage et le temps jusqu'à l'analyse. Méthode de limite de détection et de limite de quantification précisée?

Exigences de déclaration minimales pour les études d'écotoxicologie
• Signaler toute activité d'AQ/CQ pertinente entreprise au cours de l'échantillonnage et des analyses (p. ex., blancs, études de stockage, normes internes, efficacité de la récupération et techniques de préservation en entreposage particulières) et les résultats de l'AQ/CQ. • Indiquer les limites de détection, de quantification ou des rapports (limite de détection, limite de quantification et limite de rapport, respectivement) et leur variance. Valeur nominale ou mesurée utilisée dans les analyses subséquentes? • Présenter les valeurs en unités métriques comme l'analyte cible, et non comme le produit formulé. S'il y a lieu, indiquer les moyennes des valeurs mesurées et les écarts-types ou erreurs standards. Paramètres de l'exposition définis par Redman et Parkerton (2015) : [b] a. Charge en huile b. Carbone organique total (COT) c. Hydrocarbures pétroliers totaux, p. ex., RI, GC-MS, fluorescence, méthodes de contrôle utilisées d. Hydrocarbures aromatiques pétroliers totaux (HAP totaux) e. Constituants précis des hydrocarbures (BTEX, naphtalène) f. Résidus dans les tissus des classes d'hydrocarbures totaux ou précis (CL GC-MS) g. Unités toxiques (UT) en fonction des hydrocarbures dissous modélisés ou mesurés *Autres* • Indiquer clairement si les analyses statistiques subséquentes et les interprétations ont été effectuées à partir des valeurs nominales ou mesurées (voir la section 8), et si ces valeurs d'exposition ont été corrigées pour tenir compte de la récupération. • Préparer un plan pour archiver les données originales (se reporter à la section 9). • Distribution par taille des gouttelettes de pétrole[c]
6. Paramètres Est-ce que tous les paramètres surveillés, quelle que soit la réponse, ont été fournis? • Énoncer tous les paramètres surveillés dans le cadre de l'étude, quelle que soit la réaction observée (p. ex., éviter de signaler uniquement les « différences ») • Exprimer clairement quand et comment le paramètre a été surveillé et consigné (p. ex., évaluations de comportement aveugles; voir la section 2 : Conception expérimentale) et la façon dont ces données sont présentées dans le document (p. ex., tableaux, tableaux de renseignements supplémentaires). Est-ce qu'une définition claire et les unités de mesure sont fournies? • Définir le paramètre dans le but de lever l'ambiguïté (p. ex., qu'est-ce qu'une « malformation »?). *Autres* • Justifier la sélection des paramètres (voir également la section 2 : Conception expérimentale) et leur efficacité statistique (voir la section 8 : Analyse statistique). • Indiquer les autres observations qui pourraient être pertinentes, mais n'ont pas été un élément explicite de la conception de l'étude originale (p. ex., des lésions chez les poissons), car elles pourraient éclairer les travaux futurs et donner lieu à des hypothèses.
7. Présentation des résultats et des données Est-ce que toutes les données, quelle que soit leur signification statistique, sont étudiées? • L'inclusion des résultats importants d'un point de vue statistique et biologique, ainsi que des résultats non significatifs, permettra d'obtenir une compréhension équilibrée de la gamme complète des réponses. Est-ce que les données non transformées sont indiquées? • Il est utile de signaler les données sommaires (p. ex., les paramètres, les estimations, les fourchettes) dans un format de tableau, et de s'efforcer

Exigences de déclaration minimales pour les études d'écotoxicologie
d'inclure autant de données que possible, p. ex., dans les tableaux de renseignements supplémentaires (voir la section 9 : Données brutes). *Autres* • Créer des figures qui permettent aux lecteurs de mieux évaluer la distribution des données et leur variabilité (p. ex., diagrammes de dispersion, histogrammes, tracés en rectangle) pour chaque point dans le temps. Les chercheurs utilisent couramment des graphiques affichant une moyenne ± un écart-type ou une erreur standard, mais cela est problématique parce que les distributions différentes des données peuvent être représentées exactement de la même façon lorsqu'on utilise uniquement des graphiques en bandes et des graphiques linéaires (Weissgerber *et al.* 2015). En outre, les diagrammes à barres traditionnels peuvent cacher les valeurs aberrantes dans les données, ce qui peut être important, en particulier pour les études menées sur de petites tailles d'échantillons (Weissgerber *et al.* 2015). • Utiliser des échelles appropriées (p. ex., ne pas tronquer ou briser les axes pour amplifier les ampleurs ou les différences des effets par rapport aux témoins). • Fournir des détails sur la figure ou dans la légende précisant l'essai statistique utilisé (s'il y a lieu), le degré de réplication, le niveau de signification statistique (le cas échéant). • Les intervalles de confiance, avec le niveau d'alpha, doivent accompagner les statistiques sommaires dans les figures et les tableaux, plutôt que l'écart-type ou l'erreur standard. Les intervalles de confiance sont préférables aux écarts-types ou erreurs standards, car les mesures de l'incertitude ne sont pas toujours symétriques par rapport à la moyenne. Cela est particulièrement pertinent lorsque les données sont transformées pour l'analyse et que les résultats sont exprimés en valeurs reconverties. Cela s'applique également lorsque certaines structures d'erreur non normale sont utilisées, comme la formule de Poisson ou les valeurs binomiales. Ce n'est qu'avec des données à distribution normale que les écarts-types donneront des renseignements équivalents à des intervalles de confiance. • Pour les études sur le terrain, il est utile de fournir des cartes avec les renseignements pertinents (p. ex., coordonnées GPS, barres d'échelle, orientation, contexte régional) pouvant permettre au lecteur de comprendre le contexte spatial de l'étude.
8. Analyse statistique Ordinogramme statistique? • Fournir un ordinogramme statistique qui comprend toutes les vérifications des données préliminaires afin de satisfaire aux exigences du modèle ou de l'essai et aux adaptations (p. ex., transformations ou méthodes robustes) des problèmes des données, la manipulation de témoins multiples (p. ex., les solvants et les témoins négatifs), et indiquer la façon dont les tests ou modèles statistiques sont choisis et pourquoi (p. ex., OCDE 2006, 2012). Transformations justifiées? • Justifier chaque transformation (p. ex., logarithme) utilisée et si ou comment elle a une incidence sur les résultats de l'analyse. Indiquer toutes les valeurs aberrantes. • Indiquer les valeurs aberrantes statistiques et leur effet sur conclusions. Justification de la sélection et des variables du modèle? • Pour les modèles complexes (pour la régression ou la vérification des hypothèses) avec multiples variables explicatives potentielles, décrire toute méthode de sélection du modèle qui ajoute ou supprime les termes de manière séquentielle afin de donner le modèle final et, dans la mesure du possible, la vérifier par d'autres approches de manière à éviter les biais involontaires. • Préciser les critères de sélection et d'adéquation du modèle. CSEO et CMEO : est-ce que la puissance de l'essai et le pourcentage de changement sont indiqués? • Préciser la possibilité de détecter un effet de taille précis. • Il faut indiquer les intervalles de confiance pour la réponse moyenne à la CSEO et à la CMEO, avec le pourcentage de changement par rapport au témoin. • Si la réponse est non monotone (p. ex., hormèse), indiquer comment elle est traitée dans l'analyse statistique. • Définir le pourcentage de changement par rapport au témoin (le « X » dans CEx) pour savoir s'il s'applique aux données brutes ou transformées. CEx : est-ce que les estimations du modèle et les intervalles de confiance sont précisés?

Exigences de déclaration minimales pour les études d'écotoxicologie
• Indiquer lorsque les extrapolations de CEx sont des extrapolations, y compris des extrapolations inférieures à la concentration/dose positive testée la plus faible. • Fournir les intervalles de confiance pour les CEx et tous les paramètres du modèle et expliquer pourquoi les paramètres non significativement différents de zéro ont été inclus dans le modèle, puisqu'ils peuvent dénoter de possibles problèmes du modèle. *Autres* • Indiquer la puissance de la procédure de test des hypothèses prévue pour trouver les effets ou la capacité d'un modèle de régression d'estimer les CEx de manière fiable (voir la section 4 : Conditions expérimentales). Cela peut être accompli en partie en utilisant des données de contrôle historiques (voir la section 3 : Caractéristiques des organismes mis à l'essai). • Il est important de bien estimer la moyenne des témoins puisque tous les essais et toutes les estimations dépendent de cette moyenne; ainsi, s'il y avait davantage de réplicats dans le témoin que dans les groupes de traitement ou d'autres considérations particulières concernant le témoin, expliquer clairement ce qui a été fait et pourquoi. • Pour présenter les effets sublétaux dans une étude où la mortalité est importante dans les groupes de traitement élevé ou si des sujets / réplicats ont été perdus pour d'autres raisons, signaler tout ajustement apporté aux essais ou aux modèles (p. ex., la pondération) pour éviter une surinterprétation découlant de la petite taille de l'échantillon. • Expliquer comment les statistiques tiennent compte de la configuration de l'expérience réelle (p. ex., placement individuel, par deux ou en groupe, dose-réponse monotone prévue ou écarts prévus par rapport à la dose-réponse monotone, comme l'hormèse). • Les résultats doivent être présentés dans les unités d'origine et sans plus de chiffres significatifs que les données brutes ne le justifient. Par exemple, si les données sont mesurées avec deux chiffres significatifs à droite du signe décimal, il est inutile de présenter les moyennes avec cinq décimales. Cela sous-entend un niveau de précision qui n'est pas justifié par les données. De plus, la qualité des mesures détermine le nombre de chiffres significatifs qui sont utiles. Si l'équipement utilisé pour mesurer une réponse est exact uniquement au 0,1 le plus proche, mais donne cinq chiffres après le point décimal, les données doivent être présentées uniquement au 0,1 le plus proche. Les statistiques sommaires doivent être déclarées en tant que moyennes et intervalles de confiance (pas d'écarts-types ou d'erreurs standards), avec une explication de la façon dont les intervalles de confiance ont été déterminés. Cela est particulièrement important si les données transformées ont été analysées, et que les intervalles de confiance ne sont donc pas symétriques par rapport à la moyenne. • Il est utile d'exprimer le changement par rapport au témoin (pourcentage de témoin) pour la présentation, mais les données doivent également être présentées en tant que valeurs réelles enregistrées. • Signaler les valeurs d'exposition (p. ex., mesurées par rapport à nominales) qui ont été utilisées dans les estimations. • La taille minimale des effets qu'un modèle de régression peut estimer de façon fiable doit être déterminée et indiquée. Par exemple, si l'écart-type de la moyenne du témoin est de 20 % de cette moyenne, il n'est probablement pas justifié d'estimer CEx pour x b 20.
9. Données brutes Est-ce que les concentrations nominales et mesurées sont précisées? • Identification des réplicats et du traitement. • Concentrations chimiques mesurées et nominales pour chaque analyse. Est-ce que la réponse non transformée par réplicat est disponible dans une certaine forme? • Données non transformées (p. ex., non logarithmes, non normalisées) des effets biologiques au niveau de l'unité de mesure. Par exemple, les données sur les individus, si c'est ce qui est mesuré, ou les données pour des groupes d'individus lorsqu'ils sont regroupés, puis mesurés. *Autres* • Toutes les valeurs mesurées pour des conditions expérimentales qui sont connues pour avoir une incidence sur la toxicité ou la biodisponibilité des produits chimiques.